



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ TECHNIK ROZPTYLU SVĚTLA KE STUDIU
STRUKTURNÍCH A KONFORMAČNÍCH ZMĚN PŘI
INTERAKCI BIOPOLYMERŮ**

UTILIZATION OF LIGHT SCATTERING FOR THE STUDY ON THE STRUCTURAL AND CONFORMATION
CHANGES DURING THE INTERACTION OF BIOPOLYMERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Andrea Dobiášová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Michal Kalina, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1377/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Andrea Dobiášová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití technik rozptylu světla ke studiu strukturních a konformačních změn při interakci biopolymerů

Zadání bakalářské práce:

- 1) Prostudovat problematiku využití technik rozptylu světla pro detekci změn v konformaci při interakci biopolymerů.
- 2) Zvolit vhodné zástupce biopolymerů zejména z oblasti biomedicinských systémů.
- 3) Optimalizace pokročilých metod rozptylu světla v kombinaci s chromatografií a viskozimetrií pro detekci změn konformace při interakci biopolymerů.
- 4) Závěrečná diskuze aplikovatelnosti jednotlivých metod.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Andrea Dobiášová
student(ka)

Ing. Michal Kalina, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá využitím metod rozptylu světla při studiu strukturních a konformačních změn při interakci biopolymerů. Tato práce byla zaměřena na kyselinu hyaluronovou o dvou molekulových hmotnostech 250 – 450 kDa a 1500 – 1750 kDa, dále na alginát sodný a dextran hydrochlorid (DEAE). Jako interagující látky byly využity NaCl, CaCl₂ a protein BSA. V experimentální části byly využity jednoduché fyzikálně-chemické metody jako je UV-VIS spektrometrie, měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla. Jako hlavní metoda byla použita velikostně vylučovací chromatografie s detektorem rozptylu světla a viskozimetrickým detektorem. Jako hlavní kritéria studia byla molekulová hmotnost, gyrační a hydrodynamický průměr, zeta potenciál a koeficienty konformačního a Mark-Howinkova diagramu. Bylo zjištěno, že interakce probíhají mezi záporně nabitými polyelektrolyty a aditivu. Aditivum NaCl prakticky neinteragovalo se žádným polysacharidem, pouze zvyšovalo iontovou sílu. Kladně nabitý dextran interagoval pouze s proteinem BSA, i přes to, že mají stejný náboj.

Abstract

The aim of this bachelor thesis was to study structural and conformation changes during the interaction of biopolymers by light scattering methods. This study was focused on hyaluronic acid with two molecular weights 250 – 450 kDa and 1500 – 1750 kDa, on sodium alginate and dextran hydrochloride (DEAE). NaCl, CaCl₂ and BSA were used as interacting agents. Simple physical-chemical methods, like UV-VIS spectrometry, dynamic and electrophoretic light scattering, were used in experimental part. The main used method for these purposes was size exclusion chromatography coupled with light scattering and viscosimetry detectors. The studied characteristics of experiment were molecular weight, gyration and hydrodynamic radius, zeta potential and coefficients of conformation and Mark-Howinks diagrams. Interactions have been proved between negatively charged polyelectrolytes and additives. NaCl practically did not interact with any polysaccharide, only increasing ionic strength. Positively charged dextran interacted only with the BSA, despite having the same charge.

Klíčová slova

Interakce biopolymerů, strukturní a konformační změny, velikostně vylučovací chromatografie, dynamický a elektroforetický rozptyl světla

Keywords

The interaction of biopolymers, structural and conformation changes, size exclusion chromatography, dynamic and electrophoretic light scattering

DOBIÁŠOVÁ, Andrea. *Využití technik rozptylu světla ke studiu strukturních a konformačních změn při interakci biopolymerů*. Brno, 2019, 62s. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113664>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Michal Kalina.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana VUT.

.....

Andrea Dobiášová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Ing. Michalovi Kalinovi, PhD. za odborné vedení a cenné rady při psaní teoretické části bakalářské práce a zpracování výsledků. A také Ing. Šárce Sovové za pomoc s měření na SEC-MALS.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Biopolymery	8
2.1.1	Polysacharidy	9
2.2	Metodiky studia konformačních změn biopolymerů	12
2.2.1	Metody rozptylu světla	12
2.2.2	Viskozimetrie	13
2.2.3	Chromatografie	14
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	16
3.1	Polyelektrolytické komplexy	16
3.2	Charakterizace polysacharid-proteinového komplexu	18
3.3	Charakterizace proteinů pomocí SLS	19
3.4	Charakterizace proteinů pomocí DLS a viskozimetrie	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1	Materiály	23
4.1.1	Polysacharidy	23
4.1.2	Proteiny	23
4.1.3	Ostatní látky	23
4.2	Použité přístroje	23
4.3	Příprava vzorků	23
4.3.1	Příprava zásobních roztoků polysacharidů a proteinů	23
4.3.2	Příprava zásobních roztoků solí	24
4.3.3	Příprava vzorků pro měření DLS, ELS a UV-VIS	24
4.3.4	Příprava vzorků pro měření na SEC-MALS	24
4.4	Měření	24
4.4.1	UV-VIS spektrometrie	24
4.4.2	Dynamický a elektroforetický rozptyl světla	24

4.4.3	SEC-MALS	24
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	26
5.1	Záporně nabitě polyelektrolyty	26
5.1.1	Kyselina hyaluronová 250 – 450 kDa	26
5.1.2	Kyselina hyaluronová 1500 – 1750 kDa	33
5.1.3	Alginát sodný	39
5.2	Kladně nabitě polyelektrolyty	43
5.2.1	DEAE-dextran hydrochlorid	43
6	ZÁVĚR	49
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	50
8	PŘÍLOHY	52

1 ÚVOD

Biopolymery jsou přírodní vysokomolekulární látky, které mají řadu důležitých funkcí v organismech. Mezi biopolymery se řadí polysacharidy, bílkoviny a nukleové kyseliny. Aby mohli biopolymery vykonávat rozmanité funkce musí mít řadu vlastností, v kterých se mohou lišit. Biopolymery také interagují s rozmanitými látkami. Důležitými faktory k definování vlastností látek je struktura a konformace.

Při měření vzorků biopolymerů jsou zásadní vlastnosti: molekulová hmotnost, gyrační poloměr, zeta potenciál a hydrodynamický poloměr. Z těchto vlastností se dá nejlépe poznat k jakým změnám dochází v systému při míchání biopolymerů s dalšími látkami. Vlastnosti biopolymerů se dají měřit pomocí dynamického a elektroforetického rozptylu světla a jako hlavní metoda je velikostně vylučovací chromatografie s detektorem rozptylu světla a s viskozimetrickým detektorem.

Zjišťování strukturních a konformačních změn při interakcích biopolymerů mají důležitou úlohu při využití ve farmacii a medicíně, například v nosičových systémech. Dalším důležitým využitím v dnešní době je odstraňování polutantů z odpadních vod, kdy se může daný biopolymer použít v interakci s kovy.

Cílem práce je studium strukturních a konformačních změn, aby se použité biopolymery mohli dále využít. Studium bude probíhat pomocí technik rozptylu světla, protože jsou to techniky citlivé na velmi malé změny v měřených základních charakteristikách jako jsou molekulová hmotnost a velikost částic. S využitím metod rozptylu světla pak je tedy možné sledovat změny v konformaci a struktuře biopolymerů, což je rovněž hlavním cílem této BP.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biopolymery

Biopolymery jsou vysokomolekulární součásti organismů. Mezi biopolymery patří bílkoviny, nukleové kyseliny a polysacharidy. Výjimečné postavení mají bílkoviny a nukleové kyseliny, díky tomu, že jsou přítomny ve všech organismech. Vytvářejí v organismech supramolekulární organizované struktury a je v nich obsažena veškerá informace živého systému [1].

Biopolymery mají pro organismy široké spektrum důležitých funkcí: uchování a exprese genetické informace; katalýza reakcí; uchování uhlíku, dusíku, fosforu a dalších živin nebo energie; ochrana proti útoku ostatních buněk nebo nepříznivým podmínkám prostředí; senzory biotických a abiotických faktorů; komunikace s prostředím a ostatními organismy a mnohé další. Také jsou strukturními komponenty buněk, tkání a celého organismu [2].

K naplnění všech těchto funkcí musí biopolymery vykazovat rozmanité vlastnosti. Musí velmi specificky interagovat s velkým množstvím různých látek, částic, materiálů a mít k nim vysokou afinitu [2].

Pro popis struktury biopolymerů můžeme použít údaje o konstituci, konfiguraci a konformaci. Pro větší přehlednost se definuje struktura na několika úrovních podle řádu a jejich organizace. Primární struktura zahrnuje úroveň konstituce a konfigurace. Konfigurace monomerních jednotek a způsob jejich vazebného spojení jsou pro daný typ biopolymeru dány. Primární struktura je tak dána pořadím monomerních jednotek v řetězci. Sekundární struktura charakterizuje vzájemný prostorový vztah sousedních nebo blízkých monomerních jednotek v jednotlivých úsecích řetězců. Terciární struktura udává vzájemné prostorové pozice vzdálených částí řetězce a tím i hrubý tvar. Kvarterní struktura vyjadřuje způsob pravidelného prostorového uložení molekulových podjednotek, které tvoří celistvé molekuly, s jedním nebo několika kovalentně vázanými polymerními řetězci a s vlastní terciární strukturou ve větší celky [1].

Stavební jednotky se do řetězců spojují procesem kondenzace za odštěpení molekul vody a vzniku charakteristických vazebných spojení. Bílkoviny jsou pospojovány peptidovými vazbami za vzniku lineárních polypeptidových řetězců. Prostorové uspořádání nukleových kyselin je dáno tvorbou fosfodiesterových vazeb mezi jednotlivými strukturními jednotkami. Vznik řetězců polysacharidů je umožněn tvorbou glykosidových vazeb [1].

Okolo vazeb, které spojují atomy v hlavním řetězci lineárního polymeru, je většinou možná rotace. Toto dává polymeru jistý stupeň flexibility, což postačuje k tomu, aby se molekula vyskytovala v různých tvarech nebo konformacích [3].

Prostorové uspořádání biopolymeru, neboli konformace, je determinováno jeho chemickou stavbou a představuje strukturu s minimální (konformační) Gibbsovou energií. V obecném případě je struktura prostorově neuspořádaná. Takovéto struktury, kterým říkáme náhodné svinutí nebo statické klubko, postrádají jakoukoliv pravidelnost a díky nízkým energetickým bariérám snadno přecházejí jedna v druhou. Tyto konformace jsou zvýhodněny vysokou entropií. Pro některé sekvence jednotek se však stávají energeticky výhodnější pravidelné

(periodicky uspořádané) struktury. Vedle interakcí mezi jednotlivými částmi molekuly se při fixaci periodicky uspořádaných struktur nezanedbatelnou měrou podílejí i interakce molekuly biopolymeru s prostředím [1].

Prostorově organizované struktury přicházejí v úvahu především u látek v tuhém stavu, kde je možná fixace vhodné konformace. Součástí krystalů biopolymerů je však velké množství vody, která je vázána na povrchu molekul. Proto po rozpuštění ve vodě nedochází k zásadním změnám v jejich prostorovém uspořádání. Vzhledem k volnému pohybu molekul v rozpuštěném stavu je roztok složitý dynamický systém, v němž všechny jeho složky vzájemně interagují. Nelze tedy vyloučit, že dochází k fluktuaci konformací díky těmto interakcím [1].

Molární hmotnost je charakteristika, kterou lze odlišit polymery mezi sebou, nebo od nízkomolekulárních látek. Polymery se typicky skládají z molekul pokrývajících určitý rozsah molekulové hmotnosti, na rozdíl od nízkomolekulárních sloučenin, které mají jedinou molární hmotnost odpovídající jejich chemickému vzorci. Distribuce dané molekulární hmotnosti daného polymerního vzorku souvisí s mnoha důležitými vlastnostmi a také poskytuje informace o výrobním procesu nebo o změnách způsobených aplikací nebo degradací polymeru [4].

Další důležitou charakteristikou biopolymerů je gyrační poloměr. Je to parametr, který charakterizuje velikost částic libovolného tvaru. Gyrační poloměr je vzdálenost od osy rotace, v níž by musela být soustředěna veškerá hmotnost částice, aby měla stejný moment setrvačnosti jako skutečná částice. Lze jej stanovit bez ohledu na tvar částice pomocí měření rozptylu světla [5].

Částice můžeme dále charakterizovat veličinou hydrodynamického poloměru. Tato veličina odpovídá poloměru koule, která by měla za stejných podmínek stejný difúzní koeficient, jaký byl naměřen [6].

Další charakteristikou polymerů je polydisperzita systému. Je to veličina, která charakterizuje systém obsahující částice mnoha různých velikostí. Kvantitativním vyjádřením je koeficient polydisperzity. Koeficient polydisperzity je poměr hmotnostně a početně střední molární hmotnosti, výpočet je znázorněn rovnicí (1). Pro monodisperzní systém je tento koeficient roven jedné a roste s rostoucí polydisperzitou systému [7].

$$PDI = \frac{M_W}{M_N} \quad (1)$$

2.1.1 Polysacharidy

Polysacharidy jsou vysokomolekulární látky sestávající z mnoha desítek až tisíců cukerných jednotek. Vznikají jejich kondenzací za vzniku glykosidových vazeb. Stavebními jednotkami jsou nejčastěji disacharidy. Polysacharidy jsou většinou nerozpustné ve studené vodě, z některých lze v horké vodě připravit koloidní roztoky nebo gely [1].

Polysacharidy tvoří širokou škálu jedinečných a ve většině případů poměrně složitých chemických struktur, mají různé fyziologické funkce a velkou možnost různých aplikací.

Polysacharidy lze označit za obnovitelné materiály, které nabízejí potencionálně užitečné produkty [2]. Z polysacharidů lze ve vodném prostředí vytvořit mezoskopický gel. Gelová struktura zůstane zachována i po odstranění rozpouštědla a vzniká mezoporézní polysacharid [8]. Homopolysacharidy jsou polysacharidy obsahující pouze jednu monosacharidovou jednotku. Heteropolysacharidy jsou polysacharidy, které obsahují více monosacharidových jednotek [2].

Z obrovského množství teoreticky možných kombinací existuje v přírodě jen omezený počet polysacharidů (asi 300). Nejrozšířenější jsou homopolymery D-glukózy (polyglukózy, glukany). Polysacharidy se vyskytují v přírodě nejen ve volné formě, ale i vázané na lipidy, peptidy a bílkoviny [1].

Konformace polysacharidů je určována nejen konformací jednotlivých stavebních jednotek, ale také jejich vzájemnou prostorovou orientací, podmíněnou volnou otáčivostí kolem glykosidových vazeb. Určitým hodnotám diedrálních úhlů odpovídají preferované konformace o nejnižší energii [1].

Lineární polysacharidové řetězce mohou vytvářet čtyři základní uspořádané sekundární struktury, ale pouze dvě se vyskytují v přírodních polysacharidech. První je tvar nataženého pásu (lineární struktura), stabilizovaný vodíkovými vazbami mezi kyslíkovým atomem pyranózového kruhu a skupinou OH na uhlíkovém atomu C₃. Druhou je šroubovice (helix) různých rozměrů, obvykle levotočivá. V její stabilizaci mají významnou roli vedle vnitromolekulových interakcí i interakce s okolními látkami [1].

Existuje vztah mezi geometrií glykosidové vazby polysacharidů a jejich konformací. Celulóza, manany a chitin mají ekvatoriálně spojené sekvence, ze kterých je vytvořen tvar nataženého pásu. Následně podléhají tvorbě vodíkových vazeb a vytvářejí listy, které se mohou při přeměně poskládat různými způsoby. Toto znamená, že fyzikální vlastnosti nejsou závislé pouze na primární struktuře nebo na vlastnostech jednotlivých polysacharidových řetězců, ale také na způsobu, jak se řetězce spojí s podobnými molekulami nebo jiným typem polysacharidů [2].

V mnoha průmyslových aplikacích jsou polysacharidy používány při kontrole reologie materiálů s vodnou fází, zejména jako zahušťovadlo. Polymery používané při této kontrole jsou např. dextran, xanthan, alginát sodný, karboxy-metyl-celulóza a λ -karagenan. Polysacharidy se také často využívají jako gelová činidla. Zde se používají např. agar, alginát vápenatý a karagenan [2].

Alginát sodný

Algináty jsou skupina nerozvětvených, neopakujících se kopolymerů sestávajících z různého množství β -D-manurové kyseliny a α -L-gulurové kyseliny. Monomery jsou distribuovány do bloků obsahující manurové (M-bloky), gulurové (G-bloky) nebo zbytky v různém poměru (MG-bloky). Vysoká molekulová hmotnost bakteriálních alginátů a negativní náboj zajišťují vysokou hydrataci a viskozitu [2].

Průmyslové využití alginátů je spojeno s jejich schopností zadržet vodu, a díky jejich gelujícím, viskozitním a stabilizujícím schopnostem. Algináty mají také takřka teplotně nezávislé přechody sol/gel v přítomnosti multivalentního kationtu [9].

Alginát sodný se získává z hnědých řas, rostoucích v chladných vodách. Alginát je strukturní látkou v těchto řasách. Vnitrobuněčný alginátový gel dodává rostlinám mechanickou sílu a flexibilitu [9].

Algináty vykazují vysokou polydisperzitu a běžně se vyskytují v širokém rozsahu molekulových hmotností. Alginát s malou molekulovou hmotností obsahuje pouze krátké G-bloky a nepoužívá se k tvoření gelu. Naopak algináty bohaté na M-bloky mohou v gelu způsobovat problémy [9].

Dextran

Dextrany jsou definovány jako homopolysacharidy sestávající z monomerních jednotek glukóz, které obsahují značné množství α -(1 \rightarrow 6) větvení v jejich hlavním řetězci. Tyto glukany obsahují také boční řetězce spojené α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) nebo α -(1 \rightarrow 4) vazbami [2].

Dextrany jsou produkovány některými bakteriemi mléčného kvašení. Dextrany z rodu *Streptococcus* jsou klinicky zajímavé jako součást dentálního plaku. Naopak dextrany z rodu *L. mesenteroides* jsou zajímavé pro komerční využití, zejména ve farmaceutickém, výzkumném a průmyslovém odvětví [2].

Purifikovaný dextran je bílá, pevná látka bez chuti. Další fyzikální a chemické vlastnosti závisí na specifické chemické struktuře, která je předurčena mikrobiálním původem a metodou produkce. Dextrany s nejvyšším procentem vazeb α -(1 \rightarrow 6) jsou obecně nejvíce rozpustné ve vodě. Dextran z *L. mesenteroides* je volně rozpustný ve vodě a jiných rozpouštědlech. Roztoky dextranu se chovají jako newtonské kapaliny. Jejich viskozita je funkcí koncentrace, teploty a průměrné molekulové hmotnosti [2].

Hyaluronan

Hyaluronan má velmi jednoduchou strukturu, ale vše, co se této molekuly týká, je velmi složité a neobvyklé. Někdy je jeho role mechanická a strukturní (jako v synoviálních tekutinách), zatímco někdy interaguje v malých koncentracích v buňce a vyvolává důležitou odezvu. Hyaluronan má neobvyklý mechanismus biosyntézy a výjimečné fyzikální vlastnosti [2].

Hyaluronan se skládá ze základních disacharidových jednotek D-glukurové kyseliny a D-N-acetylglukosaminu, které jsou spojené pomocí β -1,4 a β -1,3 glykosidovými vazbami. Počet opakování disacharidů v kompletním hyaluronanu může dosáhnout až 10 000 s molekulovou hmotností $4 \cdot 10^6$ Da [2].

Ve fyziologickém roztoku je páteř hyaluronové molekuly vyztužena chemickými strukturami disacharidů, vnitřními vodíkovými vazbami a interakcemi s rozpouštědlem. Upřednostňovaný tvar ve vodě obsahuje hydrofobní oblasti na různých stranách a vzniká „sekundární“ struktura molekuly. Díky tomuto jsou dvě strany identické a vzniká síť i při nízkých koncentracích. V roztoku se molekuly hyaluronanu rozptýlí do náhodného klubka, které zabírá velký prostor.

Malé molekuly, jako je voda nebo elektrolyty, mohou procházet tímto prostorem. Nicméně velké molekuly, jako jsou proteiny, jsou vyloučeny z klubka díky jejich hydrodynamické velikosti v roztoku [2].

Proteiny vázající hyaluronan jsou složkami extracelulárního matrix a stabilizují jeho integritu. Hyaluronanové receptory jsou obsaženy v mobilním signálu transdukce [2].

2.2 Metodiky studia konformačních změn biopolymerů

Pro studium strukturních a konformačních změn biopolymerů je vhodné využít více metod. Mezi možné metody, které lze využít, patří spektroskopie, chromatografie, viskozimetrie, reologie a rozptyl světla. Pro zkoumání molární hmotnosti je vhodné použít chromatografii, osmometrie nebo analytická ultracentrifugace. Pro metodu koncových skupin je nejvhodnější spektroskopie. Pro polymery v roztocích je vhodné použít viskozimetrii.

2.2.1 Metody rozptylu světla

Metody rozptylu světla jsou důležité zejména proto, že patří mezi absolutní metody, kterými lze stanovit molekulovou hmotnost polymeru. Dále tato metoda může poskytnout informace o makromolekulární velikosti a struktuře, o interakci makromolekul s rozpouštědly a dalšími látkami. Výhodou je možnost aplikace této metody přes extrémně širokou škálu molekulových hmotností. Při metodě rozptylu světla jde o výsledek interakce světla s hmotou [4].

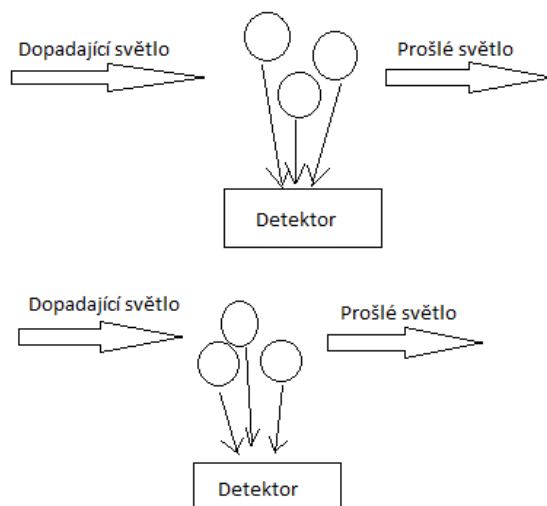
Techniky rozptylu světla lze rozdělit na čtyři skupiny, kterými jsou statický, dynamický, elektroforetický a Ramanův rozptyl světla. Statický rozptyl světla se nachází ve stejné vlnové délce jako dopadající světlo. Informace o rozptylující molekule je obsažena v úhlové a koncentrační závislosti intenzity rozptýleného světla. Dynamický rozptyl světla se také, jako statický rozptyl světla, nachází ve stejné vlnové délce jako dopadající světlo, ale místo průměrné intenzity jsou studovány fluktuace intenzity rozptýleného světla způsobeného Brownovým pohybem částic. Ramanův rozptyl se vyskytuje při jiné vlnové délce než dopadající světlo [10].

Dynamický rozptyl světla

Makromolekuly rozpuštěné v rozpouštědle podléhají Brownovu pohybu. Brownův pohyb je náhodný pohyb částic, který vzniká jako důsledek vzájemného narážení molekul. Čím jsou částice větší, tím je Brownův pohyb pomalejší [4].

Dynamický rozptyl světla měří Brownův pohyb částic, který následně přiřazuje k velikostem částic. Díky Brownovu pohybu kolísá intenzita rozptýleného světla, což je detekováno pomocí vhodného optického uspořádání. Základem je tedy měření fluktuace intenzity rozptýleného světla paprsku kolem jeho průměrné hodnoty. Při určitých časových prodlevách se rozptylující částice posouvají do jiných pozic a intenzita světla je proto na detektoru odlišná, díky odlišným vzájemným pozicím částic. Tento jev můžeme vidět na Obrázku 1. Díky neustálému pohybu částic se obraz skvrn na detektoru mění s časem. Konstruktivní a destruktivní fázové přírůstky, které jsou závislé na vzájemné pozici rozptylujících částic, způsobí fluktuaci intenzity. V případě velkých částic, které se pohybují pomalu, dochází k pomalé fluktuace. Naopak

v případě malých částic, které se pohybují rychle, dochází k rychlé fluktuaci. To znamená, že intenzita fluktuace vypovídá o pohybu částic [4].



Obrázek 1: Ilustrace rozptylu světla částicí, která podléhá Brownovu pohybu [4]

Elektroforetický rozptyl světla

Elektroforetický rozptyl světla se nachází u částic disperzního podílu, které jsou rozptýlené v disperzním prostředí obsahujícím ionty, díky tomuto se tvoří elektrická dvojvrstva. Elektrická dvojvrstva je útvar složený ze dvou opačně nabitých částí, který se vytváří při styku nabitého povrchu tuhé látky s roztokem elektrolytu. Vnitřní vrstvu tvoří nabitý povrch tuhé látky, k níž jsou elektrostatickými a adsorpčními silami přitahovány ionty opačného znaménka (protiionty), jejichž náboj neutralizuje náboj povrchu a tvoří vnější vrstvu [11].

Zeta potenciál je elektrokinetický potenciál, který se uplatňuje v koloidních systémech a působí na rozhraní mezi povrchovou vrstvou částice a okolní kapalinou. Velikost zeta potenciálu naznačuje stabilitu koloidního systému. Pokud mají částice velký kladný nebo záporný zeta potenciál budou se vzájemně odpuzovat a nebudou flokulovat (vločkovat). Naopak pokud má zeta potenciál nízké hodnoty částice se budou shlukovat a budou vločkovat. Částice se zeta potenciálem kladnějším než 30 mV nebo zápornějším než -30 mV se obecně považují za stabilní. Nejdůležitějším faktorem ovlivňující zeta potenciál je hodnota pH [12].

Elektroforetický rozptyl světla je metoda sloužící k určení hodnoty zeta potenciálu vzorku. Na vzorek dopadá paprsek laseru, který se po vpravení elektrického pole do roztoku rozptýlí a následně je snímána intenzita rozptýleného světla, která fluktuuje v závislosti na rychlosti částic [13].

2.2.2 Viskozimetrie

Viskozimetrie je v dnešní době velmi důležitou fyzikálně-chemickou metodou pro charakterizaci polymerů ve vodném roztoku. Viskozimetrie je vhodná pro určování příslušných parametrů, jako jsou struktura roztoku, objemová frakce, molekulová hmotnost, viskozita nebo termodynamické vlastnosti polymerů v roztoku [14].

Viskozita je definována jako vnitřní tření kapaliny. Do tekutiny musí být dodávána energie k vytvoření viskózní průtokové jednotky rozbitím vazeb mezi atomy a molekulami a to způsobí, že se průtokové jednotky budou pohybovat jedna za druhou. Odolnost kapaliny proti vytvoření a pohybu průtokových jednotek se nazývá viskozita tekutiny [15].

Pokud je viskozita nezávislá na rychlosti deformace pak se kapalina nazývá Newtonskou. Příklady Newtonských kapalin jsou čisté, jednofázové, nepřidružené plyny, kapaliny a roztoky s nízkou molekulovou hmotností, jako je voda. Nenewtonské kapaliny jsou kapaliny, u kterých je viskozita závislá na rychlosti deformace a jejich studium se nazývá reologie [15].

Základním principem viskozimetrů je poskytnout co nejjednodušší průtokovou kinematiku s preferovaným jednorozměrným (izomerickým) tokem, aby bylo možné stanovit rychlost smykového napětí přesně, snadno a nezávisle na typu kapaliny [15].

Pro různé polymerní roztoky se provádí charakterizace molární hmotnosti a tokových vlastností, aby se vlastnosti mohly přizpůsobit oblasti použití. Praktické stanovení molární hmotnosti a struktury roztoku se provádí pomocí viskozimetrie. Viskozita polymerního roztoku není závislá pouze na molární hmotnosti, ale také na koncentraci, rozpouštědle, typu a složení frakce polymerního roztoku, teplotě a tlaku. Měření viskozity vzorku proto často slouží jako doplňková metoda k dalším analýzám poskytující komplexní charakteristiku studovaného vzorku [14].

Dále pomocí viskozimetrie můžeme zjistit informace o struktuře polymeru v roztoku a jeho interakci s rozpouštědlem. Kromě stanovení samotné viskozimetrie je možné získat informace o molární hmotnosti, jeho interakci s molekulami rozpouštědla, o tuhosti polymerního řetězce, požadavek na objem a rozměry polymerní cívky, kritickou koncentraci [14].

Předpokladem pro stanovení přesných viskozimetrických parametrů polymerního roztoku je kromě základních bezpečnostních předpisů pro používání chemikálií a kapalin také příprava čistého vzorku a precizní provedení experimentu. Volba viskozimetru závisí na druhu polymeru, rozpouštědle a druhu přiřazení [14].

2.2.3 Chromatografie

Analýza polymerů může být provedena ve třech různých režimech kolonové kapalinové chromatografie: molekulová vylučovací chromatografie (SEC), kapalinová chromatografie (LC) při kritických podmínkách a různé druhy kapalinové chromatografie založené na entalpických interakcích [4].

Informace o molární hmotnosti je důležitá v mnoha odvětvích polymerní vědy pokrývající teorii, syntézu, vlastnosti a finální aplikaci. Kombinace SEC s detektorem rozptylu světla a také s viskozimetrií může poskytnout více informací o molekulární struktuře. Molární hmotnost velmi souvisí s vlastnostmi polymerů. Výhodou SEC v porovnání s jinými metodami je její rychlost a jednoduchost přípravy vzorků [4].

SEC byla tradičně používána pro určování molekulové hmotnosti různých biopolymerů. Hlavním nedostatkem SEC je obtížnost získání vhodných standardů, které mají stejný

hydrodynamický objem jako vzorky v roztoku pro kalibrační křivku. SEC kombinována s rozptylem světla byla běžně používána k určení molekulové hmotnosti, distribuce molekulové hmotnosti a konformaci řetězce polymeru bez pomoci standardních vzorků. Použitím dat hmotnostních průměrů molekulové hmotnosti a gyračního poloměru, je možné získat distribuci molekulové hmotnosti a gyračního poloměru díky chromatografii. Navíc lze určit tzv. konformační diagram popisující závislost molární hmotnosti na gyračním poloměru, dále lze zjistit užitečné informace týkající se konformace biopolymerů [16].

SEC hraje důležitou roli při charakterizaci různých biopolymerů nejčastěji polysacharidů, jako je škrob, dextran a hyaluronová kyselina, a také proteinů. Kalibrace založená na dextranových standardech může poskytovat chybné výsledky dokonce i když je použita na stanovení dextranových vzorků, kvůli možným rozdílným stupňům větvení standardů a analyzovaných vzorků [4].

Makromolekuly mohou zaujímat různé konformace díky rotaci kolem jednoduché kovalentní vazby. Ve většině případů je přecházení z jedné konformace do druhé velmi jednoduché a polymery se mění mezi povolenými konformacemi. Molekuly, které mění svoje konformace, se nazývají náhodná klubka (random coil). Typickými polymery tohoto typu jsou syntetické polymery v roztoku. Pokud je přechod z jedné konformace do druhé nemožný, molekuly jsou neměnné a vykazují velmi rozdílné vlastnosti než polymery v náhodném klubku. Příklady polymerů s neměnnou konformací jsou polymery při nízkých teplotách, v krystalickém stavu nebo biopolymery v nativním stavu [17].

Ve velmi zředěných roztocích jsou interakce polymer-polymer zanedbatelné a vlastnosti vzorku jsou dány rovnováhou mezi interakcemi polymer-polymer a interakcemi polymer-rozpouštědlo, což záleží na termodynamických vlastnostech rozpouštědla. V tzv. dobrých rozpouštědlech jsou výhodnější interakce polymer-rozpouštědlo než interakce polymer-polymer. Polymerní řetězec má tendenci k solvatování, interakce polymer-polymer jsou minimalizovány a je produkován poměrně velký vylučovací objem [17].

3 Současný stav řešené problematiky

Látky, se kterými biopolymery mohou interagovat, jsou různé. Například mohou interagovat s tenzidy, kovy nebo biopolymery přímo mezi sebou. Při interakcích se může měnit konformace a velikost komplexu [4].

Z aplikačního hlediska jsou důležité interakce biopolymerů s kovy, protože kovy představují v dnešní době polutanty způsobující výrazné znečištění životního prostředí kvůli velkému množství průmyslových zplodin uvolněných do půd a vod a tím vysoké riziko pro lidské zdraví a životní prostředí. Nejpoužívanější metodou čištění vod se ukázala metoda aktivovaného kalu, který velmi dobře odstraňuje kovové ionty. Biopolymer je aktivovaným kalem, který pochází z biologické syntézy a je exkrečním produktem z lytické aktivity bakterií. Vynikající vazebná aktivita je především přiřazována biopolymerům s funkčními skupinami, jako jsou karboxylové, hydroxylové, aminové a fosforečné skupiny. Trojrozměrné excitační emisní matice jsou schopny zaznamenat změny složení a konformace biopolymerů po navázání těžkých kovů, což může změnit konfiguraci a strukturu a odpovídajícím způsobem i fluorescenční spektrum [18].

Další důležitou aplikací interakcí biopolymerů je interakce s tenzidy. Iontové tenzidy se obvykle pojí s polymery, neiontové tenzidy interagují s většinou homopolymerů. Spojení iontového tenzidu s hydrofilním homopolymerem je silně kooperativní a začíná v poměrně dobře definované oblasti koncentrace tenzidu. Sdružování je nejlépe popsáno jako micelace vyvolaná polymerem. V přítomnosti polymeru tvoří micely při nižší koncentraci než normální CMC (kritická micelární koncentrace). Pro tenzidy je tvorba micel silně ovlivněna elektrostatickými interakcemi, které vedou k hodnotám CMC řádově vyšších než u neiontových. U neiontových tenzidů je stabilizace micel homopolymerem malá nebo nevýznamná [19].

Nativní a modifikovaný hyaluronan interaguje s povrchově aktivními látkami (tenzidy). Hyaluronan je silně hydrofilní molekula, zatímco většina léků je špatně rozpustná ve vodě. Nativní hyaluronan má řadu výhod oproti jednoduchým hyaluronanovým lékům, jako je cílené řízené uvolňování a zlepšená rozpustnost ve vodě. Tenzidy se tak používají pro zlepšení rozpustnosti a biologické dostupnosti účinné látky. Obecně interakce s polyelektrolyty s protikladně nabitými tenzidy našly využití v některých průmyslových aplikacích, například koloidní flokulace při čištění vody [20].

3.1 Polyelektrolytické komplexy

Polyelektrolytické komplexy můžeme rozdělit do dvou skupin, kdy prvním typem (PEC) jsou komplexy kationtových a aniontových polyelektrolytů. Druhým typem (PE-surfs) jsou komplexy aniontových polyelektrolytů s kationtovými surfaktanty, a naopak kationtových polyelektrolytů s aniontovými surfaktanty. V nejjednodušší formě je pozorována tvorba komplexu mezi opačně nabitými druhy při smísení ve vodném roztoku [21].

Smícháním roztoků polyaniontů s polykationty vede ke spontánnímu vytvoření interpolymerního komplexu za uvolnění protiiontů. Tvorba komplexu může probíhat jak mezi polykyselinami s polybázemi, tak mezi neutralizovanými kovovými a halogenidovými solemi.

Hnací silou tvorby komplexu je zejména nárůst entropie v důsledku uvolňování nízkomolekulárních protiiontů [21].

Prvním krokem pro určování složení PEC bylo nalezení stechiometrické iontové vazby, tj. stupně konverze. Využívanými technikami pro určování koncového bodu stechiometrie PEC jsou turbidimetrie, potenciometrie, konduktometrie, elektroforetický rozptyl světla a koloidní titrace. Pro silné elektrolyty byla nalezena ve většině případů stechiometrie koncového bodu 1:1 [21].

Při tvorbě PEC ve vodném roztoku nejdříve elektronová mikroskopie ukázala na polydisperzní systém s téměř sférickými částicemi. Dále byla struktura charakterizována pomocí statického a dynamického rozptylu světla. Statický rozptyl světla v tradičním způsobu analýzy poskytuje data o hmotnostním průměru částic a průměru gyračního poloměru. Dále může poskytovat informace o typu konstrukce, polydisperzitě a také umožňuje výpočet strukturální hustoty. Dynamický rozptyl světla díky kumulativnímu přizpůsobení korelační křivky poskytuje průměrnou hodnotu difúzního koeficientu a pomocí Stokes-Einsteinova vztahu také hydrodynamický poloměr [21].

Strukturní parametry PEC se měnily jen nepatrně s molárním poměrem míchání. Hmotnost a velikost komplexu se snížila, hustota však zůstala téměř konstantní. Pokles hmotnosti lze vysvětlit pomocí spotřeby přebytečné složky. Při zvyšování poměru míchání nedochází k zvětšování částic, ale vytváří se částice nové. Sekundární agregace a makroskopické vločkování nastaly přibližně při směšovacím poměru 1:1. Dokonce i v extrémně zředěných roztocích polyelektrolytů se částice PEC skládají z několika stovek jednotlivých polyelektrolytových řetězců [21].

Soli mají důležitou úlohu při vzniku vysoce agregovaných PEC díky tomu, že oslabují elektrostatické interakce a umožňují přesmyk. Přítomnosti již malého množství NaCl vedlo k dramatickému snížení úrovně agregace PEC. Zvýšení iontové síly způsobilo sekundární agregaci a zvýšení hmotnosti a velikosti [21].

Nejčastěji používanou metodou pro výrobu nanotrubiček je metoda cíleného vrstvení jednotlivých komponent založená na elektrostatických interakcích. Kromě elektrostatických interakcí ovlivňují výrobu i další parametry jako je rozdíl ve velikosti a znaménku zeta potenciálu, molekulová hmotnost polyelektrolytů, struktura a flexibilita polymerů. Extrakční parametry, které mohou ovlivnit ukládání polymerů na povrchu, jsou poměr koncentrací, složení rozpouštědla, teplota disperze a reakce mezi polymery [22].

Polymery, které se pro výrobu nanotrubek používají, by měly být snadno dispergovatelné ve zvoleném rozpouštědle, kterým bývá nejčastěji voda. Dispergované biopolymery by měly mít velké opačné náboje a měly by být schopny tvořit nekovalentní interakce (vodíkové můstky, iontové vazby nebo elektrostatické interakce) s templátovou membránovou a následujícími vrstvami. Potenciální aplikace nanoturbulárních systémů závisí na stabilitě a typu použitých polymerů [22].

Bylo zjištěno, že tvorba nanotrubek za použití hovězího albuminu a alginátu sodného je silně ovlivňována rozdílem zeta potenciálu, velikosti pórů templátu a koncentrací biopolymerů. Měřením zeta potenciálu bylo zjištěno, že hnacími silami interakcemi mezi hovězím albuminem a alginátem sodným jsou elektrostatické síly. Nanotrubky tvořené z alginátu sodného jsou stabilní a silné při optimálních výrobních podmínkách, kdy musí být přesný poměr biopolymerů. Pokud je nižší koncentrace, než tato ideální dochází k tvorbě tenčích vrstev [22].

3.2 Charakterizace polysacharid-proteinového komplexu

Asociace a fázové chování proteinů a polysacharidů se používá pro mikroenkapsulaci složek, prodávání léčiva s řízeným uvolňováním nebo pro stabilizaci mléčných nápojů. Ve vodě rozpustný komplex proteinů a polysacharidů by mohl být užitečný při navrhování nových funkčních struktur s přidanou hodnotou [23].

Ganoderma lucidum se v čínské medicíně často využívá jako tradiční lék při léčbě různých onemocnění jako je chronická hepatopatie, hypertenze, hyperglykémie a rakovina. Její aktivní složky mají širokou škálu biologických aktivit, včetně protinádorové, antioxidantní a imunitní stimulace. Právě polysacharidy *Ganodermy lucidum* jsou jednou z účinných látek. Biologická aktivita polysacharidů navíc souvisí s vazbou na protein. Proto byly zkoumány interakce polysacharidů z *Ganodermy lucidum* s hovězím albuminem (bovine serum albumin – BSA). Právě BSA se nejvíce používá jako proteinový model pro analýzu interakcí proteinu s některými běžnými polysacharidy [23].

Analýza informací o konformační struktuře BSA v přítomnosti polysacharidů *Ganodermy lucidum* byla prováděna pomocí metod UV-VIS spektroskopie, infračervené spektroskopie, fluorescence a cirkulárního dichroismu. Pomocí těchto metod bylo zjištěno, že při vzniku polysacharid-proteinového komplexu, vázanými převážně vodíkovými vazbami, došlo ke konformačním změnám proteinu. Přítomnost polysacharidů zvyšuje tepelnou stabilitu proteinu BSA během tepelného denaturačního procesu [23].

Polysacharidy a polysacharid-proteinové komplexy jsou důležité ve vodě rozpustné biopolymery, které se využívají jako aditiva v jídle a ve farmacii. Arabinózová guma je velmi rozvětvený arabinogalaktanový polysacharid s rhamamnózovými koncovými jednotkami a koncovými jednotkami gulurové kyseliny obsahující velmi malé množství proteinů. Okolo 70 – 80 % arabinózové gummy je složena z homogenního polysacharidu obsahujícího malé množství proteinu, zbytek je arabinogalaktan-proteinový komplex se širokou škálou vysoké molekulové hmotnosti. Obvykle polysacharid-proteinový komplex má relativně vysokou polydisperzitu a často obsahuje dvě frakce s rozdílnou molekulovou hmotností. Pro rozdělení a charakterizaci konformace a kompozice jednotlivých frakcí je důležité zvolit vhodnou metodu, kterou je vylučovací chromatografie [16].

Glukan-proteinový komplex byl izolován z mycelia *Ganoderma tsugae* pomocí tří extrakcí s 0,2 M fosfátovým puforem při 80 °C. Supernatant byl dále upravován pomocí Sevag metody pro odstranění volných proteinů, odbarven 30% H₂O₂ a nakonec dialyzován proti vodě z kohoutku po sedm dní proti destilované vodě po tři dny [16].

Polysacharid-proteinový komplex rozpustný ve vodě byl charakterizován pomocí velikostně vylučovací chromatografie s detektorem laserového rozptylu světla pro ukázání dvou frakcí. Bylo zjištěno, že komplex byl složen z proteinově vázaných polysacharidů s rozdílnou molekulovou velikostí, proteinovým obsahem a konformací. SEC s detektorem laserového rozptylu světla má výhodu ve studiu konformace a součástí komplexu biopolymerů s vysokou polydisperzitou bez předešlé izolace a purifikace [16].

3.3 Charakterizace proteinů pomocí SLS

Určení oligomerního stavu a podjednotkové stechiometrie membránových proteinů v roztoku detergentů je velmi složité, protože množství detergentů asociovaných s proteiny je většinou neznámý. Hmotnostní poměr proteinů a detergentů v protein/detergentní micelě se může lišit v závislosti na proteinu a původu detergentu. Pro proteiny se k charakterizaci obvykle využívá vylučovací chromatografie, která se v tomto případě však využít nedá kvůli přítomným detergentům. Výslednou molekulovou hmotnost nelze rozdělit mezi proteiny a detergenty, protože není známo množství detergentních molekul ve vzorku. Dvě klasické metody mohou měřit absolutní molekulovou hmotnost proteinů bez předpokladu vázaných detergentů nebo tvaru proteinu. Těmito metodami jsou sedimentační centrifugace a statický rozptyl světla [24].

Před aplikací vzorku membránových proteinů do instrumentace velikostně vylučovací chromatografie s detektorem statického rozptylu světla (SEC/LS) musí být vzorek purifikován ve dvou krocích. Následně je potřeba vzorek zakonzentrovat a následně byl protein analyzován pomocí SEC/LS. Ve výsledném chromatogramu se objeví hlavní pík, který znázorňuje proteiny a následně se spočítá jejich molekulová hmotnost. Detektor rozptylu světla zobrazí ještě jeden přídatný pík, který znázorňuje detergenty ve vzorku [24].

Velikostně vylučovací chromatografie se využívá pro oddělení micel, které obsahují proteiny našeho zájmu a pro zajištění, že je protein rozpuštěný ve správném pufru. Eluční objem není zahrnován do výsledných výpočtů [24].

3.4 Charakterizace proteinů pomocí DLS a viskozimetrie

Pomocí dynamického rozptylu světla a viskozimetrie byl zkoumán účinek přídavku dodecylsírany sodného (SDS) na distribuci molekulární velikosti polymeru syrovátkového proteinu. Srovátkový protein je původem z mléka a patří mezi nejpoužívanější a nejúčinnější doplňky stravy na podporu růstu svalové hmoty, regenerace, ale také na podporu hubnutí. Je to tedy důležitá složka potravin. Asi 85-90 % objemu mléka tvoří právě syrovátka. Srovátkové bílkoviny jsou známy vysokou biologickou hodnotou [25].

Polymerizace a agregace srovátkových proteinů probíhá díky chemickým a fyzikálním interakcím. Pokud je protein zahříván nad denaturační teplotu a při hodnotách pH nad 4, dochází k disulfidové výměnné reakci, která má za následek vytváření polymerů. K fyzikálním interakcím umožňujícím vznik polymeru patří vodíkové můstky a hydrofobní interakce [25].

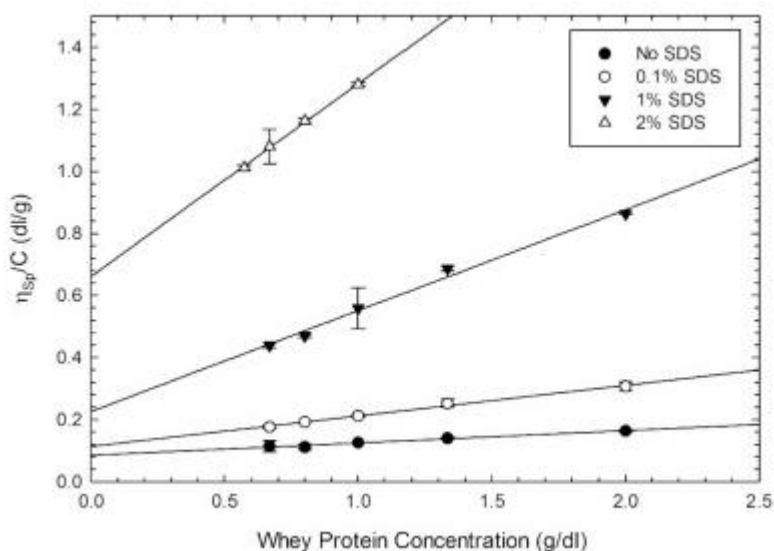
Hydrofobní interakce mohou být rozštěpeny pomocí tenzidů, což jsou povrchově aktivní látky, mezi něž patří i SDS. Snižují povrchovou a mezifázovou energii, proto se samovolně

koncentruje na fázovém rozhraní. Přidáním SDS vede k denaturaci proteinů díky tomu, že rozbije hydrofobní interakce mezi bočními řetězci [25].

Z proteinu v práškovém stavu byl připraven roztok, přidáním destilované vody a následně byla upravena koncentrace roztoku na 8 hmotnostních %, zatímco pH nebylo upravováno. Tento roztok byl zahříván na 80 °C, aby došlo k denaturaci bílkovin. Po ochlazení roztoku na laboratorní teplotu byla jeho koncentrace upravena na 5 hmotnostních %, aby byla možnost lepší detekce agregátů. K takto připravenému roztoku bylo přidáno SDS [25].

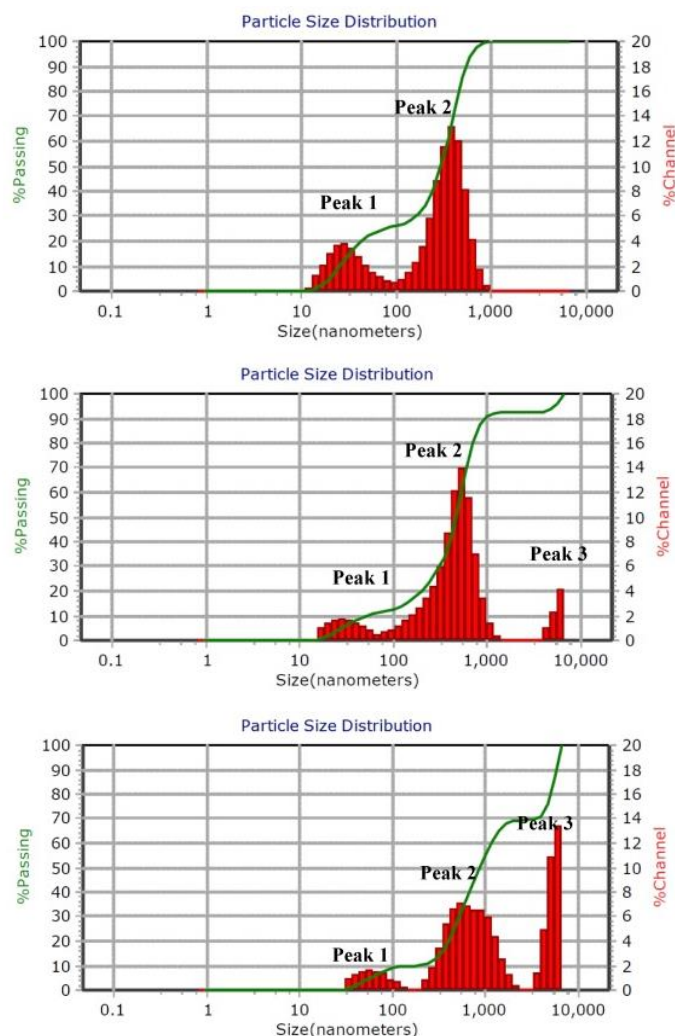
Dynamický rozptyl světla byl měřen pomocí přístroje Nanotracer wave II, který měří částice v rozmezí 0,8 až 6500 nm. U přístroje je použita řízená referenční metoda, která poskytuje citlivost a přesnost měření. Úhel měření v tomto přístroji je 180° [25].

Obrázek 2 znázorňuje údaje o redukované viskozitě roztoků polymerních syrovátkových proteinů při různých koncentracích SDS. Předpokladem je, že rozštěpením hydrofobních interakcí dochází k snížení velikosti molekuly a tím také ke snížení redukované viskozity. Podle výsledků měření je však tendence přesně opačná. Při přidávání SDS se zvyšuje viskozita, a to jak vnitřní, tak redukovaná. Tento jev může být způsoben přítomností vzniklých komplexů SDS-protein [25].



Obrázek 2: Závislost viskozity na koncentraci SDS [25]

Pomocí dynamického rozptylu světla byl proměřen jak protein bez SDS, tak protein s SDS o různých koncentracích. Samotný protein vykazuje bimodální distribuci molekulové velikosti. Obrázek 3 ukazuje distribuci samotného proteinu, tak i proteinu s SDS. Po srovnání grafů můžeme vidět, že po přidání SDS se oba vrcholy samotného proteinu posunuly k větším velikostem a také se zde objevil vrchol třetí. Na třetí části obrázku můžeme vidět, že se zvyšující se koncentrací SDS se vrcholy posouvají k ještě větším velikostem [25].



Obrázek 3: Molekulární velikost syrovátkového proteinu [25]

Autoři práce [26] charakterizovala fyzikálně-chemické vlastnosti dvou globulárních proteinů – bílkovinného sérového albuminu (BSA) a lidského sérového albuminu (HSA). Zkoumané vlastnosti byly difúzní koeficient (hydrodynamický poloměr), elektroforetická mobilita a dynamická viskozita.

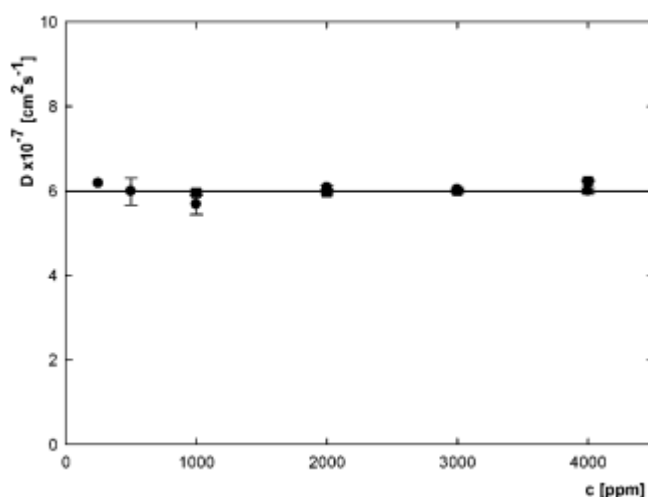
Adsorpce a depozice (nevratná adsorpce) proteinů na hraniční plochy jsou významné v různých oborech, jako jsou geofyzika, materiálové a potravinářské vědy, farmaceutický a kosmetický průmysl. V lékařství bylo zjištěno, že trombóza kardiovaskulárního systému je způsobena právě depozicí proteinů. Procesy adsorpce proteinů se podílejí také na koagulaci krve, porušení umělých orgánů, tvorbě plaku a znečištění kontaktních čoček. Nicméně kontrolovaná adsorpce proteinů může být uplatňována při účinné separaci, čištění chromatografií, filtraci pro biosenzory a bioreaktory, sérologické a imunologické testy [26].

Aby byla umožněna správná kontrola depozice a adsorpce proteinů musí být důkladně prozkoumána strukturní a transportní vlastnosti, zejména tvar, konformace, stupeň hydratace, náboj, difúzní koeficient a stupeň agregace ve vztahu k objemu proteinu, pH, iontové síle a teplotě. K určení těchto vlastností se používají metody dynamického rozptylu světla, měření

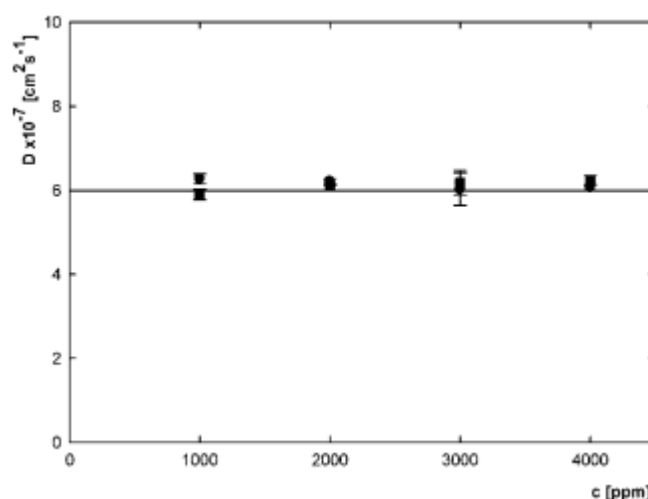
dynamické viskozity, sedimentační rychlosti, fluorescenční depolarizace a měření cirkulárního dichroismu [26].

Dynamický rozptyl světla byl použit pro měření velikosti proteinu na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments). Měření je neinvazivní a výsledkem měření je fluktuace intenzity rozptýleného světla. Analýzou fluktuace získáme difúzní koeficienty, které jsou převedeny na distribuci velikosti. Také byl stanoven hydrodynamický poloměr a jeho distribuce, který poskytuje informace polydisperzi vzorku [26].

Obrázek 4 ukazuje výsledky získané pro BSA a Obrázek 5 výsledky získané pro HSA. Z obrázků vyplývá, že difúzní koeficient BSA prakticky nezávisí na objemové koncentraci. V případě HSA jsou výsledky v rámci experimentálních chyb velmi podobné [26].



Obrázek 4: Závislost difúzního koeficientu BSA na koncentraci [26]



Obrázek 5: Závislost difúzního koeficientu HSA na koncentraci [26]

4 Experimentální část

4.1 Materiály

4.1.1 Polysacharidy

Alginát sodný	Sodium alginate CAS 9005-38-3, Sigma-Aldrich spol. s r. o., č. š.: MKBL7997V
Dextran	DEAE – Dextran hydrochloride CAS 9064-91-9, Sigma-Aldrich spol. s r. o., č. š.: BCBQ8681
Kyselina hyaluronová	Hyaluronic acid, $M_w = 250 - 450$ kDa č.š.: 230215-E1 Hyaluronic acid, $M_w = 1500 - 1750$ kDa č. š.: 160218-E1

4.1.2 Proteiny

BSA	Bovine serum albumin CAS 9048-46-8, Sigma-Aldrich spol. s r. o., č. š.: SLBK0931V
-----	--

4.1.3 Ostatní látky

Chlorid sodný	Sodium chloride, $M_w = 58,44$ g/mol CAS 7647-14-5, Sigma-Aldrich spol. s r. o., č. š.: SLBW9219
Chlorid vápenatý	Calcium chloride, $M_w = 147,02$ g/mol CAS 017-013-00-2, PENTA, č. š.: 1708230812

4.2 Použité přístroje

Zetasizer Nano ZS	Malvern instruments Ltd.
UV-VIS spektrofotometr U-3900/3900H	Hitachi High-Technologies Global
SEC-UV-MALS-dVIS-dRI	Agilent Technologies + Wyatt Technologies

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Příprava zásobních roztoků polysacharidů a proteinů

Bylo naváženo 0,200 g daného biopolymeru na laboratorních vahách s přesností 1/1 000 g. Následně bylo toto množství biopolymeru rozpuštěno v daném množství demineralizované vody ve 100 cm³ odměrných baňkách, aby vznikl zásobní roztok o koncentraci biopolymeru 2 g·dm⁻³.

4.3.2 Příprava zásobních roztoků soli

Bylo naváženo potřebné množství soli, tak aby výsledná koncentrace soli v roztoku byla $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Potřebné množství soli bylo rozpuštěno v daném množství demineralizované vody v 500 cm^3 odměrných baňkách.

4.3.3 Příprava vzorků pro měření DLS, ELS a UV-VIS

Rozředěním zásobního roztoku polysacharidů byly vytvořeny koncentrační řady, kdy obsah příslušné soli byl 0 mM; 10 mM; 50 mM; 100 mM; 150 mM; 500 mM a 1 000 mM. Výsledný objem vzorků byl 10 cm^3 . Vzorky pro interakci polysacharidů a BSA byly získány rozředěním zásobního roztoku polysacharidů a BSA, aby výsledné koncentrace BSA ve vzorku byla $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$; $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$; $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$; $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výsledný objem vzorků byl 10 cm^3 .

4.3.4 Příprava vzorků pro měření na SEC-MALS

Rozředěním zásobního roztoku polysacharidů byly vytvořeny koncentrační řady, kdy obsah příslušné soli byl 0 mM; 10 mM; 50 mM; 100 mM; 150 mM; 500 mM a 1 000 mM. Výsledný objem vzorků byl 5 cm^3 . Vzorky pro interakci polysacharidů a BSA byly získány rozředěním zásobního roztoku polysacharidů a BSA, aby výsledné koncentrace BSA ve vzorku byla $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$; $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$; $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$; $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výsledný objem vzorků byl 5 cm^3 . Všechny vzorky byly před analýzou přefiltrovány přes stříkačkový filtr s póry o velikosti $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ (nylonová membrána).

4.4 Měření

4.4.1 UV-VIS spektrometrie

Vzorky byly měřeny v křemenných kyvetách proti demineralizované vodě. Absorpce byla změřena od 200 nm do 900 nm. Absorpční spektrum bylo následně zpracováno v MS Excel a byly vytvořeny grafy každého biopolymery s interagující látkou.

4.4.2 Dynamický a elektroforetický rozptyl světla

U všech vzorků byla proměřena velikost na přístroji Zetasizer Nano ZS, kdy byly vzorky měřeny ve skleněných kyvetách vytemperovány na $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Každý vzorek byl proměřen vždy třikrát. Naměřená data byla následně zprůměrována v programu MS Excel a byly stanoveny jejich směrodatné odchylky, které jsou v grafech znázorněny v podobě chybových úseček.

Dále byl u všech vzorků proměřen zeta potenciál na přístroji Zetasizer Nano ZS, kdy byly vzorky měřeny ve skleněných kyvetách vytemperovány na $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Každý vzorek byl proměřen vždy třikrát a byla do něj vložena Dip cela s elektrodami, přes které na vzorek působilo elektrické napětí. Naměřená data byla následně zprůměrována v programu MS Excel a byly stanoveny jejich směrodatné odchylky, které jsou v grafech znázorněny v podobě chybových úseček.

4.4.3 SEC-MALS

Před analýzou pomocí SEC-dVI-MALS-dVIS-dRI byly všechny vzorky připravené dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.4 přefiltrovány přes stříkačkový filtr s póry o velikosti $0,45 \text{ } \mu\text{m}$.

Vzhledem k molekulové hmotnosti vybraného roztoku kyseliny hyaluronové byla zvolena vhodná kolona (PL Aquagel-OH MIXED-H, 8 μm , 300x7,5 mm). Jako mobilní fáze byl použit dusičnan sodný o koncentraci 0,1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ s přidavkem azidu sodného o koncentraci 5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Pouze v případě studia interakcí polysacharidu DEAE-dextran hydrochlorid byla kvůli eliminaci sorpce dextranu na stacionární fázi kolony využita mobilní fáze obsahující dusičnan sodný o koncentraci 0,8 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ s přidavkem azidu sodného o koncentraci 5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Objem nástřiku každého analyzovaného vzorku do systému byl 50 μl a průtok systémem byl nastaven na 0,6 cm^3 za minutu. Jako inkrement indexu lomu byly zadány následující hodnoty – 0,165 $\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ pro vzorky obsahující kyselinu hyaluronovou a alginát sodný, 0,126 $\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ pro vzorky obsahující karagenan a 0,156 $\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ pro vzorky obsahující DEAE-dextran hydrochlorid. Každý vzorek byl proměřen minimálně třikrát a doba analýzy jednoho vzorku byla cca. 60 minut. Všechna naměřená data byla vyhodnocena pomocí softwaru Astra 6.1.

5 Výsledky a diskuze

V této práci jsou zkoumány interakce vybraných polysacharidů se třemi různými látkami, a to zejména pomocí metod rozptylu světla. Vybrané polysacharidy jsou dextran hydrochlorid-DEAE jako kladně nabitý polyelektrolyt, dále jako záporně nabitý polyelektrolyt jsou vybrané kyselina hyaluronová o dvou molekulových hmotnostech a alginát sodný. Interagující látky jsou NaCl, CaCl_2 a BSA. Při interakcích je očekávané působení elektrostatických sil. Mezi polysacharidy a NaCl nejsou očekávané interakce, spíše půjde o ovlivňování zvyšováním iontové síly. Případné interakce jsou očekávané u CaCl_2 , kdy bude docházet k interakci polysacharidu s iontem Ca^{2+} . Změny v konformaci v důsledku interakce lze také očekávat ve směsích obsahujících polysacharidy s BSA. Při tvorbě roztoků koncentračních řad vznikají gely při vyšších koncentracích aditiv. Dále se tyto interakce mohou využít v technologii nosičových systémů.

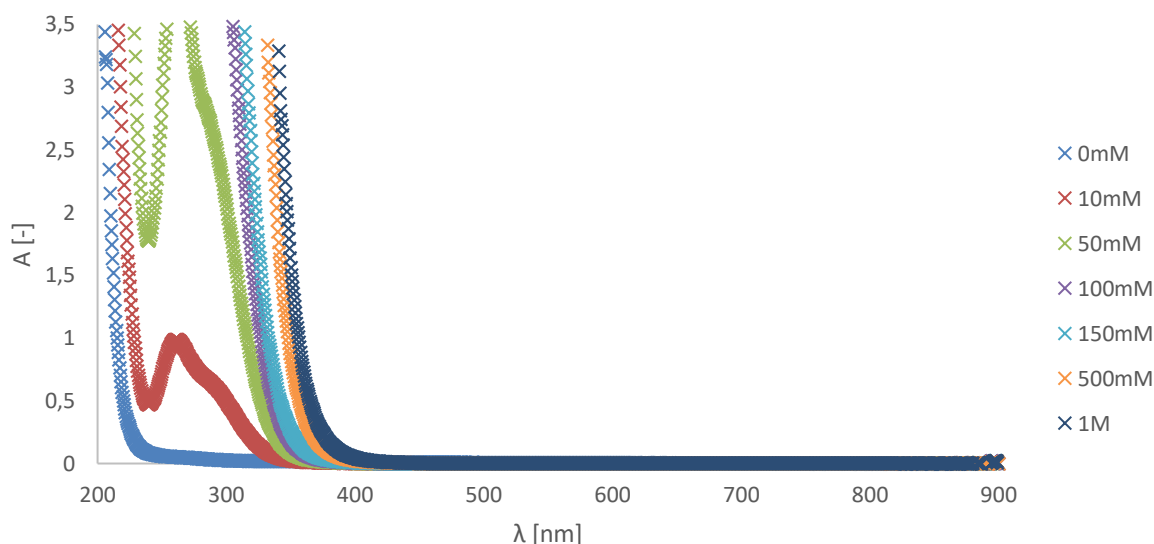
Jednotliví zástupci biopolymerů (polysacharidů) a interagujících látek byli zvoleni tak, aby mezi některými bylo možné očekávat interakci v důsledku opačného náboje (Ca^{2+} ionty a hyaluronan a alginát) a mezi zbylými naopak ne (Ca^{2+} ionty a DEAE-dextran). V případě BSA jde o tvorbu polysacharidovo-proteinového komplexu, kterou lze očekávat v jistém rozsahu u všech zástupců polysacharidů. V případě kladně nabitého DEAE-dextranu nejsou očekávány interakce v případě solí. Jednotlivé skupiny látek byly zvoleny zejména vzhledem k jejich aplikačnímu potenciálu při tvorbě polyelektrolytových komplexů a nosičových systému, které jsou založeny na tvorbě komplexu. V rámci této práce ovšem je cílem prostudovat tyto systémy v nižších koncentracích a poměrech, než dojde k vytvoření komplexů a případné následné fázové separaci.

5.1 Záporně nabitý polyelektrolyt

5.1.1 Kyselina hyaluronová 250 – 450 kDa

Jednoduché fyzikálně-chemické metody

Jako první použitá metoda byla UV-VIS spektrometrie, která ukázala, zda dochází ke vzniku komplexu, který by posouval celé absorpční spektrum nahoru po ose y. Na Obrázku 6 můžeme vidět, že absorbance roste s rostoucí koncentrací aditiva. To je způsobené přidáním aditivem, absorbuje nejspíše aditivum. Vzorky byly měřeny proti MQ vodě, proto při vyšších koncentracích již může být absorbance zvýšená i tím, že rozpouštědlo již není MQ voda, ale spíše roztok NaCl v MQ vodě. Při vyšších koncentracích NaCl byl také pozorován velký šum při nižších vlnových délkách. Zbylé grafy absorpčních spekter jsou v příloze práce (Obrázek 28, Obrázek 29). Průběh spekter je v principu stejný, absorbance se zvyšuje s rostoucí koncentrací aditiva, a to je způsobeno spíše daným aditivem, než-li interakcí.

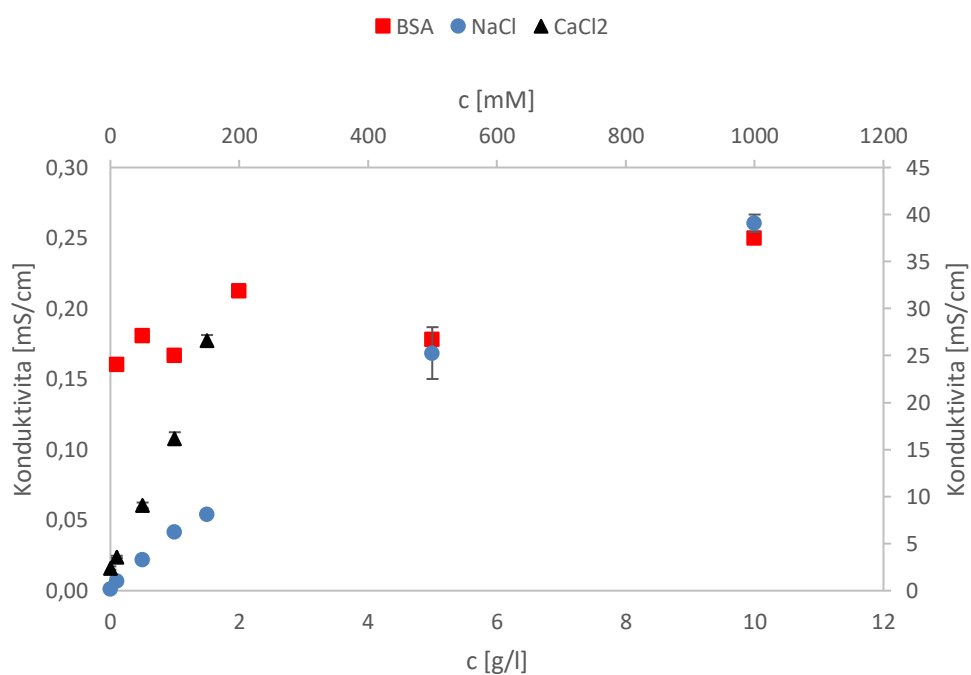


Obrázek 6: Absorpční spektrum pro interakci kyseliny hyaluronové 250 -450 kDa s NaCl

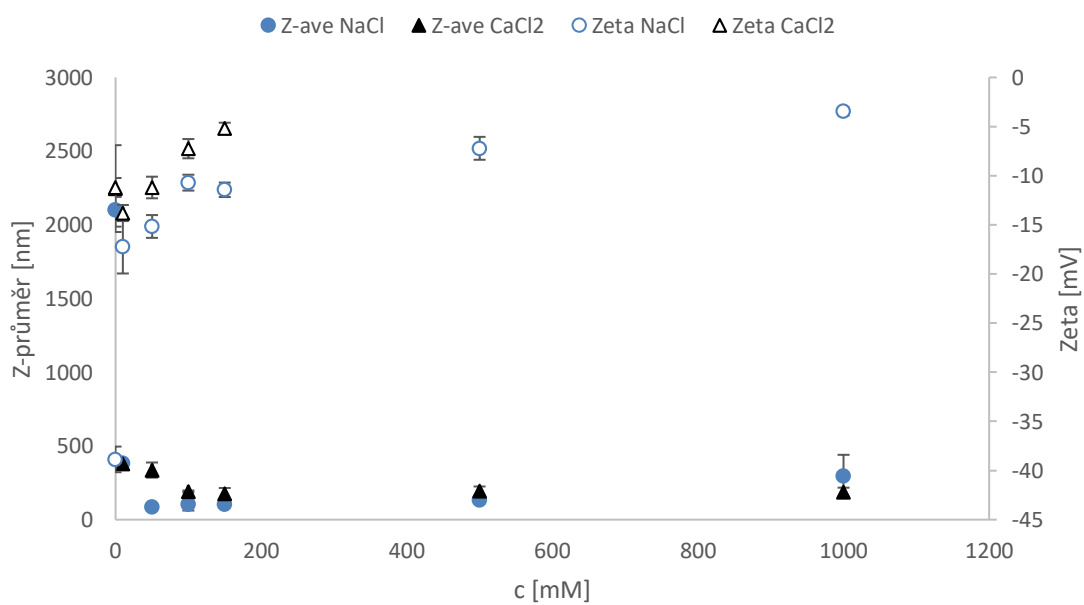
Další použitou metodou bylo měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla. Při měření dynamického rozptylu světla bylo pohlíženo na parametr z-průměr, což je velikostní parametr, který ukazuje hydrodynamický průměr částic ve vzorku. Toto měření může být ovlivněno velkými částicemi, které zastíní rozptyl světla převažujících menších částic. U vzorků kyseliny hyaluronové může být pozorováno rapidní snižování hydrodynamického průměru s rostoucí koncentrací aditiva, které ukazuje Obrázek 8 a Obrázek 9. To je způsobeno tím, že přidávkem aditiva se zvyšuje iontová síla, nízkomolekulární ionty odstiňují náboj na řetězcích, což umožňuje vznik kompaktnějších struktur s menší průměrnou detekovanou velikostí. Při měření elektroforetického rozptylu světla bylo pohlíženo na parametry zeta potenciálu a vodivosti. Vodivost vzorků polysacharidu se solemi roste s rostoucí koncentrací aditiva, a to proto, že se přidává vodivější látka, než je polysacharid sám, což znázorňuje Obrázek 7. Naopak absolutní hodnota zeta potenciálu klesá s rostoucí koncentrací aditiva, což je způsobeno postupným odstíněním náboje na řetězcích biopolymerů nízkomolekulárními ionty. To způsobuje pokles absolutní hodnoty měřeného zeta potenciálu směrem k nule, a tedy i k destabilizaci měřeného vzorku. Tyto výsledky jsou v souladu s výše pozorovanou a diskutovanou změnou velikosti částic, to znázorňuje Obrázek 8. Na Obrázku 7 může být u vzorků kyseliny hyaluronové s proteinem BSA pozorována pouze malá změna ve vodivosti. Kompletní výsledky tohoto měření shrnuje Tabulka 1.

Tabulka 1: Výsledky z měření DLS a ELS

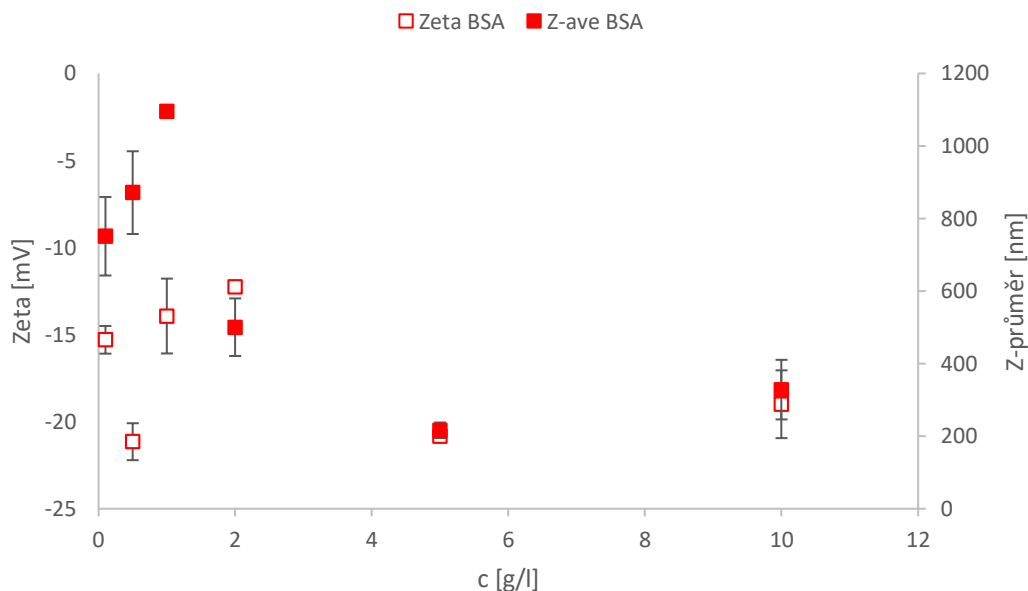
NaCl	c [mM]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0	0,192±0,002	2102±114	-38,9±1,3
	10	1,047±0,057	384±3	-17,2±2,8
	50	3,310±0,156	84±5	-15,2±1,2
	100	6,237±0,205	102±41	-10,7±0,8
	150	8,140±0,027	106±11	-11,4±0,7
	500	25,267±2,754	134±13	-7,2±1,2
	1000	39,067±0,929	297±143	-3,5±0,4
CaCl ₂	c [mM]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0	2,407±0,179	2246±294	-11,2±1,0
	10	3,590±0,122	379±13	-13,8±0,8
	50	9,090±0,284	336±51	-11,2±1,1
	100	16,167±0,681	191±7	-7,3±1,0
	150	26,633±0,551	175±40	-5,2±0,6
	500		194±31	
	1000		187±30	
BSA	c [g/l]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0,1	0,160±0,003	751±108	-15,3±0,8
	0,5	0,181±0,003	871±114	-21,2±1,1
	1	0,167±0,002	1096±4	-13,9±2,2
	2	0,213±0,001	500±79	-12,3±0,2
	5	0,178±0,002	216±21	-20,8±0,1
	10	0,250±0,001	328±82	-19,0±2,0



Obrázek 7: Závislost vodivosti vzorku na koncentraci aditiva



Obrázek 8: Závislost zeta potenciálu a hydrodynamického průměru na koncentraci aditiva NaCl, CaCl₂



Obrázek 9: Závislost zeta potenciálu a hydrodynamického průměru na koncentraci aditiva BSA

Chromatografie

Stěžejní metodou, která byla využita pro studium konformačních změn při interakci hyaluronanu s jednotlivými látkami byla SEC-chromatografie s detekcí MALS, diferenčního viskozimetru a diferenčního refraktometru. Získané výsledky jsou sumarizované v Tabulce 2. Podle očekávání nedochází k interakcím mezi kyselinou hyaluronovou a NaCl. Molekulová hmotnost a gyrační poloměr postupně klesají, což znázorňuje Tabulka 2, to je nejspíše způsobené změnou iontové síly. Dochází pouze ke změně iontové síly, a tím způsobuje změnu v konformaci řetězců, kdy jsou postupně s rostoucí koncentrací tyto struktury kompaktnější, což je vidět na snižujícím se koeficientu konformačního diagramu. Dále se struktury natahují do delších tyčinkovitých struktur, to je patrně na zvyšujícím se koeficientu Mark-Howinkovy rovnice. Oba tyto koeficienty jsou vyneseny na Obrázku 10. Takovéto struktury mají také nižší viskozitu, kterou lze nalézt v Tabulce 2. Podle očekávání nedochází k agregaci, což je zřetelné z toho, že se naměřená koncentrace mění pouze nepatrně.

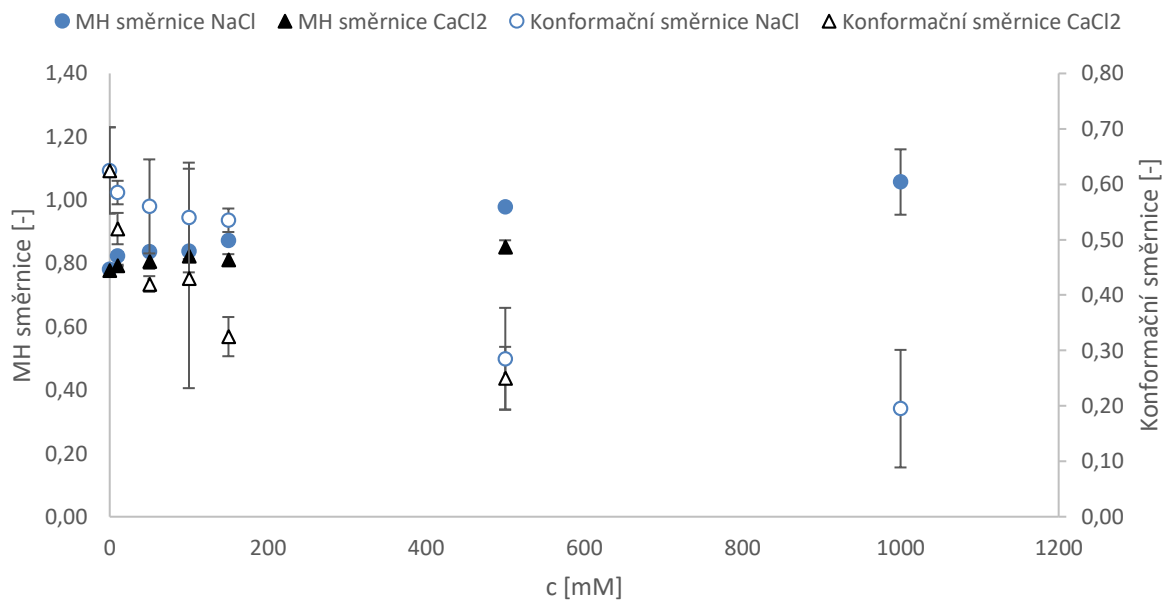
Při interakci kyseliny hyaluronové s CaCl_2 dochází k interakci polysacharidu s Ca^{2+} ionty, díky opačnému náboji. Zpočátku má tato interakce jen nepatrný vliv na molekulovou hmotnost, resp. gyrační poloměr a vnitřní viskozitu (Tabulka 2). Od koncentrace 500 mM aditiva dochází ke skokovým změnám ve vlastnostech a patrně také k agregaci, což se projevuje nárustem molekulové hmotnosti, gyračního poloměru a také poklesem detekované koncentrace ve vzorku. Vzorek s koncentrací 1000 mM aditiva již nešel měřit, nejspíše z důvodu zagregování a odfiltrování již před analýzou.

Při analýze interakcí s BSA se ve výstupu objevily dva píky, kdy první pík odpovídá nejprve čisté kyselině hyaluronové a postupně se zvyšujícím se přídatkem BSA nepatrně roste molekulová hmotnost a gyrační poloměr (Obrázek 31), což naznačuje tvorbu komplexu kyseliny hyaluronové s BSA a první pík tedy odpovídá tomuto komplexu. Tvar se také s rostoucí koncentrací BSA mění, koeficient konformačního diagramu se příliš nemění, ale

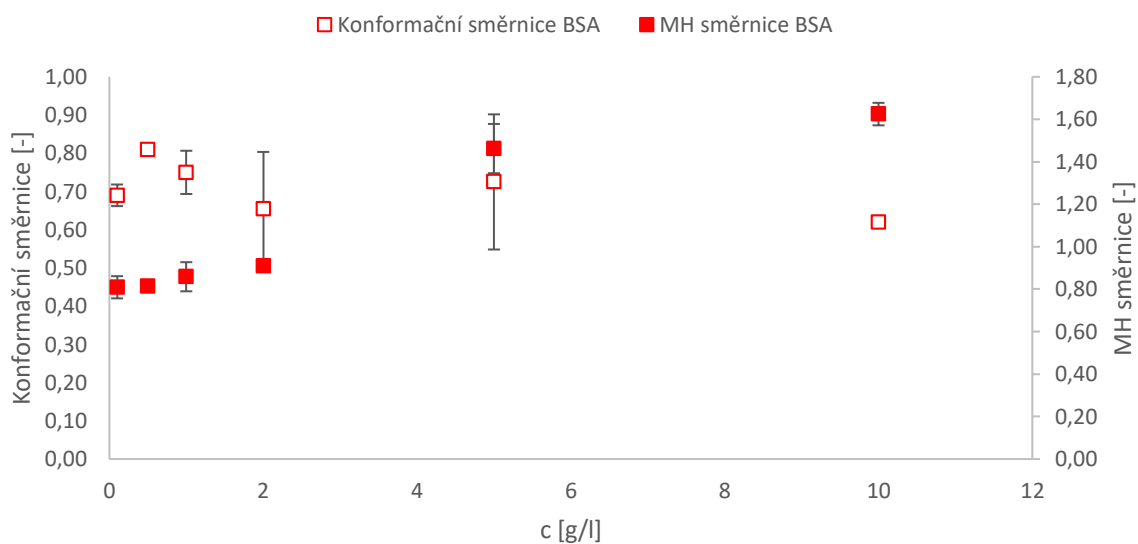
koeficient Mark-Howinkovy rovnice roste (Obrázek 11), což ukazuje na to, že vzniklé struktury se protahují. Vnitřní viskozita se však zvyšuje (Tabulka 2), což může naznačovat, že navázaný BSA brání přiblížení řetězců hyaluronové kyseliny a vzniku tyčinkovitých struktur. Druhý pík znázorňuje pravděpodobně nevázaný protein BSA.

Tabulka 2: Naměřená data ze SEC-MALS

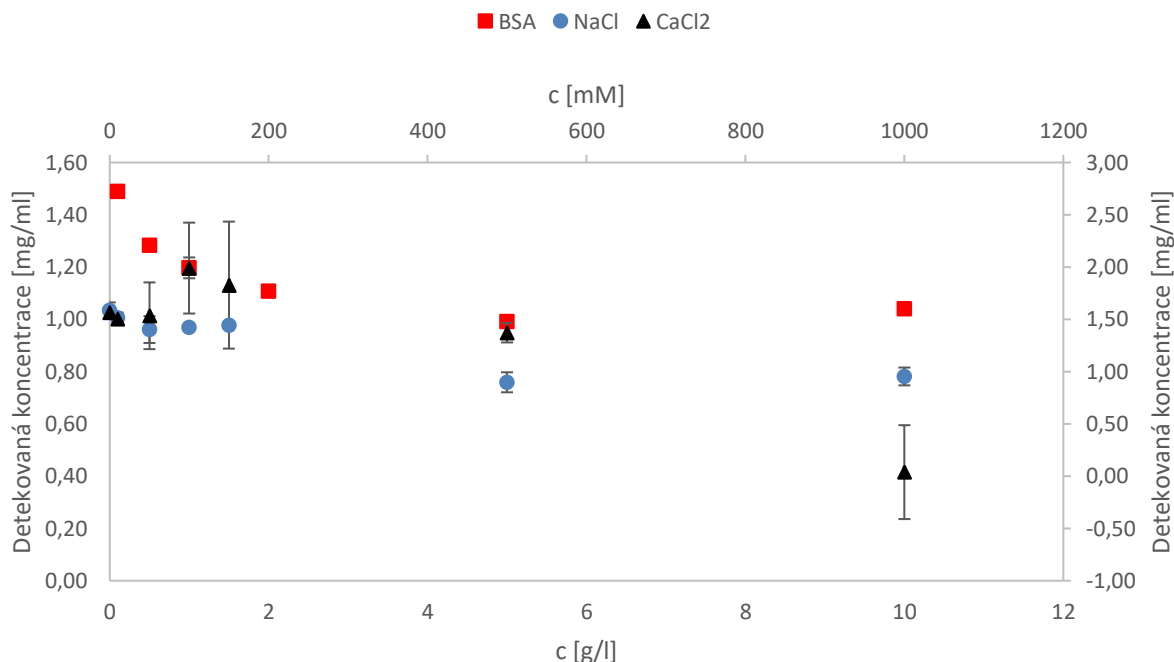
NaCl	c [mM]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Vnitřní viskozita [mL/g]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0	256±10	55,6±1,1	414±3	1,59±0,08
	10	240±7	52,8±1,5	404±2	1,52±0,05
	50	240±10	51,6±15	392±4	1,40±0,13
	100	233±7	50,6±0,9	388±1	1,42±0,01
	150	224±1	50,0±0,0	381±4	1,45±0,00
	500	105±5	26,4±1,6	156±21	0,90±0,10
	1000	67±13	24,1±2,6	84±2	0,95±0,09
CaCl ₂	c [mM]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Vnitřní viskozita [mL/g]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0	294±9	60,1±0,9	473±15	1,57±0,06
	10	294±7	58,6±0,2	484±13	1,51±0,04
	50	309±6	58,1±1,7	453±94	1,53±0,32
	100	318±3	56,0±1,0	473±113	1,99±0,43
	150	327±2	57,6±1,3	577±33	1,83±0,61
	500	419±68	56,5±1,9	742±109	1,37±0,09
	1000				0,04±0,45
BSA	c [g/l]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Vnitřní viskozita [mL/g]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0,1	299±2	62,4±1,3	477±5	1,49±0,00
	0,5	314±5	66,0±1,2	496±3	1,28±0,02
	1	331±4	66,6±0,1	517±8	1,20±0,04
	2	338±14	64,5±3,2	529±28	1,11±0,02
	5	352±13	67,2±3,0	545±27	0,99±0,15
	10	354±1	65,5±1,8	548±2	1,04±0,02



Obrázek 10: Závislost konformační a MH směrnice na koncentraci aditiva NaCl a CaCl₂



Obrázek 11: Závislost konformační a MH směrnice na koncentraci aditiva BSA



Obrázek 12: Závislost detekované koncentrace na koncentraci aditiv

Z Obrázku 12 plyne, že v případě NaCl a BSA se nijak výrazně nemění detekovaná koncentrace, jen u BSA na počátku pozvolna klesá, protože se zde inkorporují molekuly BSA. V dalších případech jsou vazebná místa vyvázána, tak už to dále neinteraguje. Naopak u CaCl₂ je vidět mezi 500 mM a 1M roztoky prudký pokles detekované koncentrace, což souvisí s agregací a následným odfiltrováním vzniklých agregátů před chromatografickou analýzou.

5.1.2 Kyselina hyaluronová 1500 – 1750 kDa

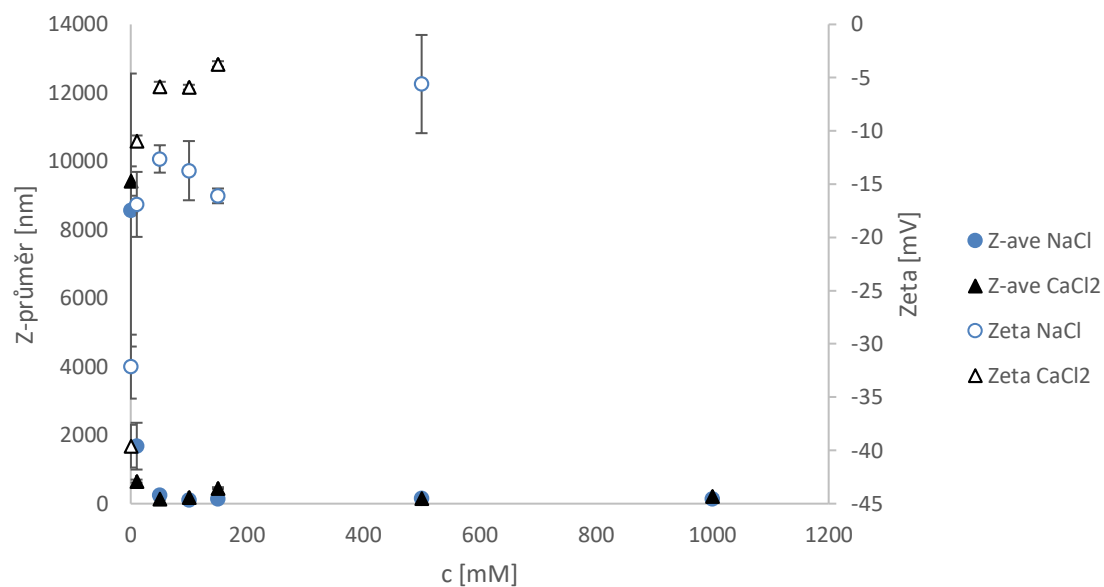
Jednoduché fyzikálně-chemické metody

Absorpční spektra vzorků kyseliny hyaluronové s molekulou hmotností 1500 – 1750 kDa mají podobný průběh jako absorpční spektra vzorků kyseliny hyaluronové s molekulou hmotností 250 – 450 kDa a můžou být nalezeny v příloze (Obrázek 33, Obrázek 34, Obrázek 35). Pouze u spektra kyseliny hyaluronové s CaCl₂ dochází k velmi nepatrnému nárůstu absorbance s rostoucí koncentrací aditiva.

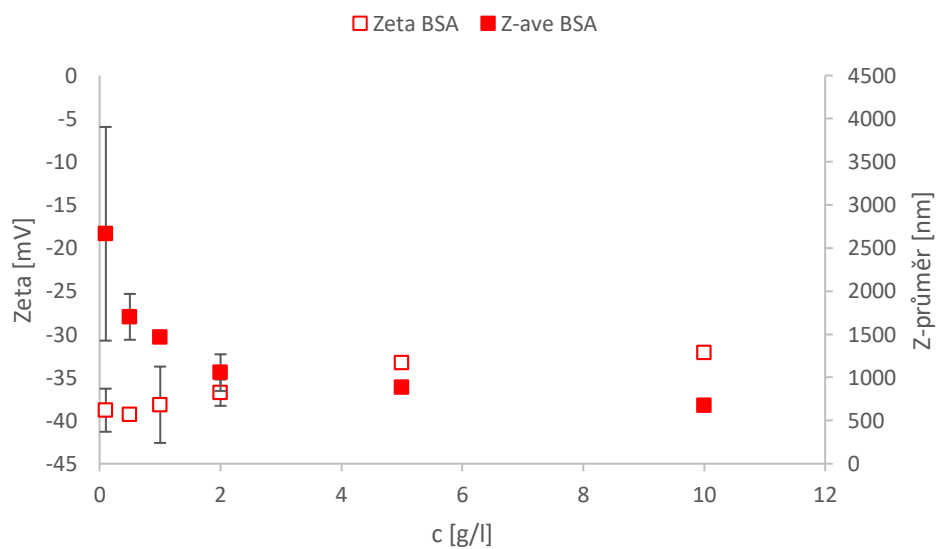
Výsledky měření DLS a ELS ukázaly velmi podobné tendence jako výsledky při studiu nízkomolekulární kyseliny hyaluronové. Hydrodynamický průměr velmi rapidně klesá zejména u solí, o něco méně klesá u BSA, což ukazují Obrázek 13 a Obrázek 14. Pokles hydrodynamického průměru je způsoben iontovou silou přidaného nízkomolekulárního iontu, který odstiňuje náboj řetězců a tím dávají prostor k vzniku kompaktnějších struktur. Vodivost u solí naopak roste, u BSA roste pozvolna, to ukazuje Obrázek 15. Zeta potenciál u solí roste, u přídavku BSA zůstává téměř neměnný, což znázorňuje Tabulka 3. To opět souvisí se změnou iontové síly a odstínění náboje řetězce nízkomolekulárními látkami, a to způsobí pokles absolutní hodnoty zeta potenciálu směrem k nule.

Tabulka 3: Naměřená data DLS a ELS

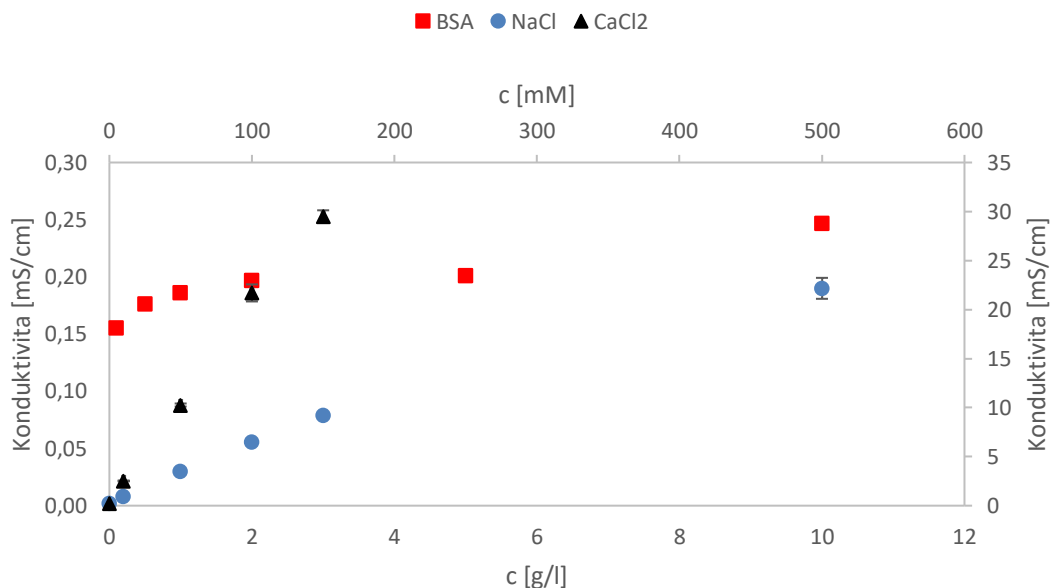
NaCl	c [mM]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0	0,220±0,029	8577±3988	-32,1±3,0
	10	0,950±0,077	1679±683	-16,9±3,0
	50	3,493±0,177	247±69	-12,6±1,3
	100	6,493±0,301	114±13	-13,7±2,8
	150	9,190±0,147	145±26	-16,1±0,7
	500	22,167±1,069	157±30	-5,6±4,6
	1000		145±22	
CaCl ₂	c [mM]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0	0,213±0,005	9424±429	-39,6±2,0
	10	2,520±0,046	659±44	-10,9±0,5
	50	10,267±0,153	142±31	-5,8±0,4
	100	21,700±0,872	193±13	-5,9±0,2
	150	29,500±0,625	456±26	-3,7±0,3
	500		149±0	
	1000		213±28	
BSA	c [g/l]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0,1	0,155±0,003	2665±1238	-38,8±2,5
	0,5	0,176±0,002	1703±266	-39,3±0,7
	1	0,186±0,002	1467±67	-38,2±4,4
	2	0,197±0,001	1056±212	-36,8±1,5
	5	0,201±0,002	884±27	-33,3±0,7
	10	0,247±0,001	676±17	-32,1±0,7



Obrázek 13: Závislost hydrodynamického průměru a zeta potenciálu na koncentraci aditiv NaCl a CaCl₂



Obrázek 14: Závislost hydrodynamického průměru a zeta potenciálu na koncentraci aditiva BSA



Obrázek 15: Závislost vodivosti na koncentraci aditiv

Chromatografie

Výsledky jsou znovu velmi podobné měření hyaluronové kyseliny 250 – 450 kDa. S NaCl nedochází k interakcím, dochází pouze ke změně iontové síly. Díky změně iontové síly se mění konformace řetězců, řetězce se stávají kompaktnější, to je vidět na snižujícím se koeficientu konformačního diagramu. Zároveň se zvyšuje koeficient Mark-Howinkovy rovnice, a to ukazuje na to, že se řetězce natahují do delších tyčinkovitých struktur (Obrázek 10). Takovéto struktury mají také nižší vnitřní viskozitu. Nedochází zde k agregaci, což naznačuje minimální změna detekované koncentrace (Obrázek 32).

Interakce může být pozorována mezi Ca^{2+} ionty a polysacharidem, a to díky opačnému náboji. Při nižších koncentracích aditiva nedochází k větším změnám v molekulové hmotnosti, gyračním poloměru a vnitřní viskozitě (Tabulka 4). Při vyšších koncentracích však dochází ke skokové změně vlastností a také nejspíše k agregaci. Projevilo se to nárůstem molekulové hmotnosti, gyračním poloměru a poklesem detekované koncentrace ve vzorku.

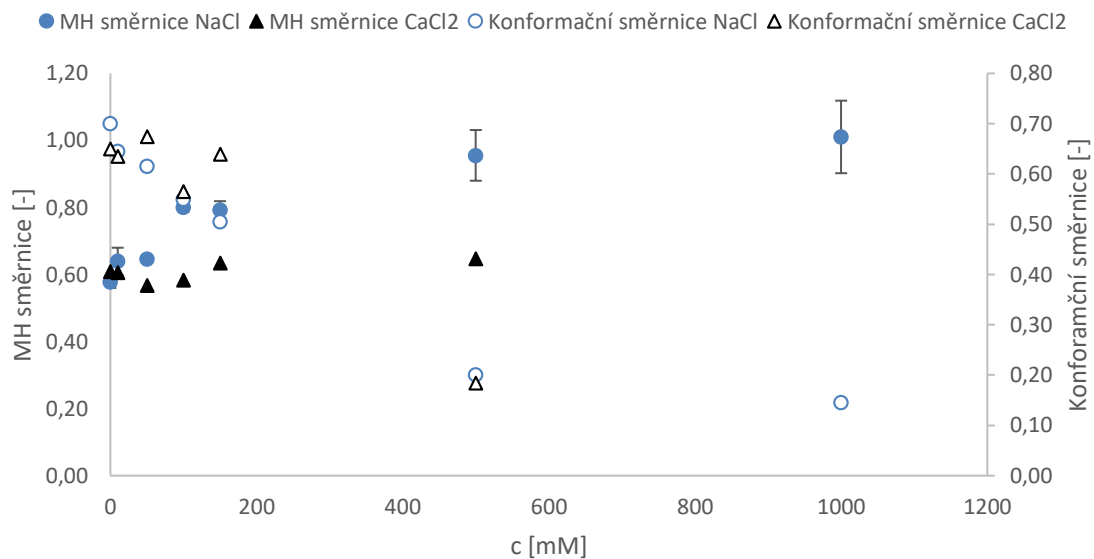
Ve výstupu z měření se objevily dva píky, kdy první pík odpovídá nejprve čisté kyselině hyaluronové a druhý pík nejspíše odpovídá nevázanému BSA. Pro první pík tedy při postupném zvyšování koncentrace BSA roste molekulová hmotnost a částečně i velikost částic, což naznačuje interakci kyseliny hyaluronové s BSA a tvorbu komplexu (Tabulka 4). Tvar se také částečně mění, zatímco koeficient konformačního diagramu zůstává téměř stejný, z čehož je zřejmé, že s přidávkou BSA nedochází ke vzniku kompaktnějších struktur, dojde patrně k jistému navázání BSA mezi řetězce hyaluronanu ovšem s dalším přidávkou BSA již dále nedochází ke vzniku kompaktnějších struktur, jak tomu bylo v případě studia interakcí hyaluronanu s NaCl resp. CaCl_2 . Naopak z rostoucí hodnoty koeficientu Mark-Houwinkovi rovnice je zřejmé, že vzniklé komplexy jsou více protažené (Obrázek 11). Toto tvrzení by napovídalo snižování vnitřní viskozity, v tomto případě však viskozita roste, což ukazuje

Tabulka 4. To by mohlo být následkem vlivu navázaného BSA, který brání přiblížení řetězců kyseliny hyaluronové a tím brání vzniku tyčinkovitých struktur. Druhý pík, který odpovídá nevázanému BSA, ukazuje, že BSA je zde v nadbytku a jeho molekulová hmotnost se nemění, to znázorňuje Tabulka 5.

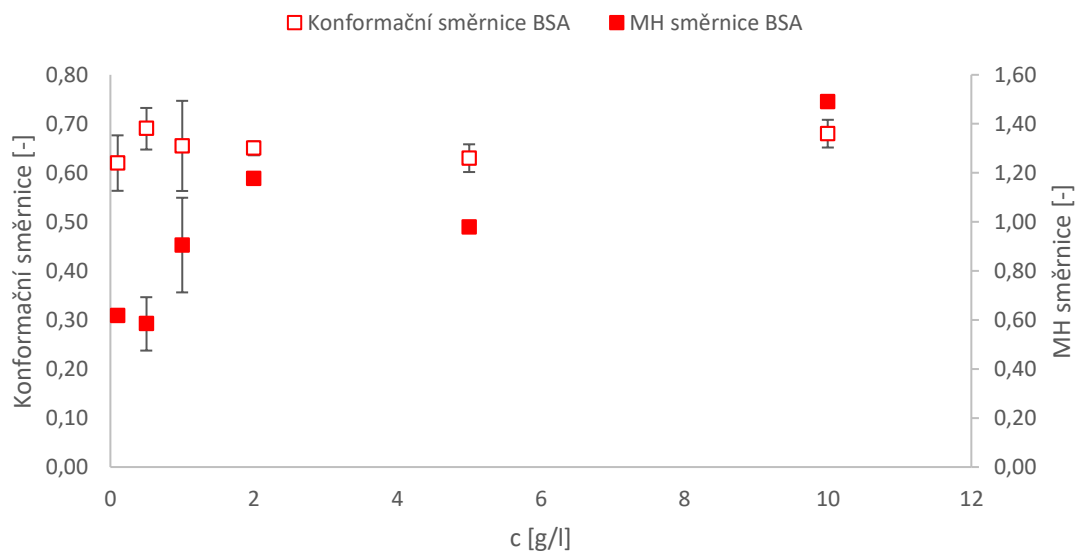
Nižší naměřené molekulové hmotnosti, než zadané výrobcem jsou nejspíše způsobené degradací již práškového biopolymeru. Při měření roztoku čisté kyseliny hyaluronové byla naměřena molekulová hmotnost kolem 1000 kDa.

Tabulka 4: Naměřená data ze SEC-MALS

NaCl	c [mM]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Vnitřní viskozita [mL/g]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0	910±26	116,9±5,3	1109±7	1,11±0,09
	10	840±51	115,8±7,4	1034±2	1,17±0,14
	50	832±18	109,0±2,9	1054±4	1,06±0,07
	100	426±21	70,5±2,3	682±31	0,88±0,02
	150	352±17	60,8±3,6	587±15	0,96±0,04
	500	98±8	25,4±1,9	195±4	0,85±0,02
	1000	69±9	24,8±3,3	104±10	0,78±0,03
CaCl ₂	c [mM]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Vnitřní viskozita [mL/g]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0	1021±32	131,9±1,6	1132±40	1,25±0,06
	10	1036±47	130,0±2,8	1170±65	1,20±0,12
	50	1270±34	131,3±0,1	1430±32	1,00±0,03
	100	1286±113	130,8±0,1	1452±129	1,02±0,09
	150	1392±63	131,9±0,6	1501±3	0,87±0,01
	500	4850±157	176,0±8,0	2869±80	0,12±0,02
	1000				0,08±0,09
BSA	c [g/l]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Vnitřní viskozita [mL/g]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0,1	842±7	112,5±2,3	1032±11	1,01±0,03
	0,5	941±55	122,8±0,5	1106±51	1,00±0,04
	1	1025±13	125,0±2,3	1170±23	0,97±0,05
	2	1125±4	133,4±1,7	1233±24	1,00±0,06
	5	1127±47	127,1±0,6	1170±6	1,08±0,03
	10	1097±49	133,5±3,7	1166±61	1,12±0,01



Obrázek 16: Závislost konformačního a MH koeficientu na koncentraci aditiva NaCl a CaCl₂



Obrázek 17: Závislost konformačního a MH koeficientu na koncentraci aditiva BSA

Tabulka 5: Hodnoty pro nevázané BSA

c [g/l]	Mw [kDa]	Rw [nm]
0,1	74,70	25,35
0,5	74,16	13,60
1	74,01	9,60
2	72,84	8,10
5	73,27	5,40
10	72,08	8,50

5.1.3 Alginát sodný

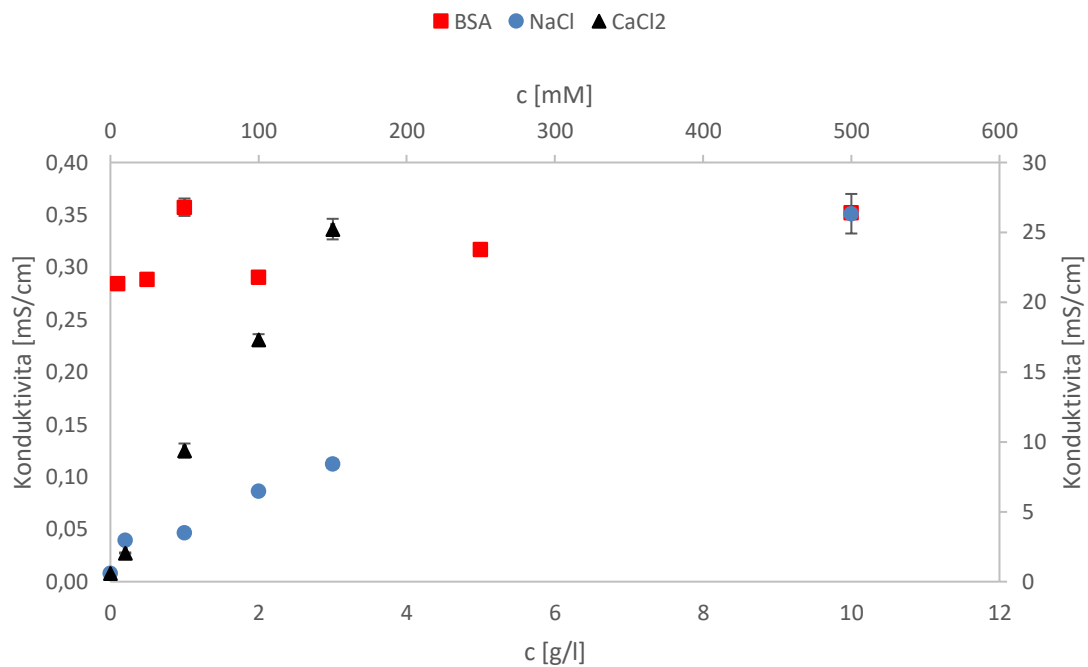
Jednoduché fyzikálně-chemické metody

Metodou UV-VIS spektrometrie byla naměřena absorpční spektra všech vzorků. S narůstající koncentrací přidaného aditiva roste také absorpční spektrum. Absorpční spektrum pro aditivum CaCl_2 se liší, a to nejspíše kvůli zagregování alginátu s aditivem. Příslušná spektra jsou v příloze (Obrázek 39, Obrázek 40, Obrázek 41).

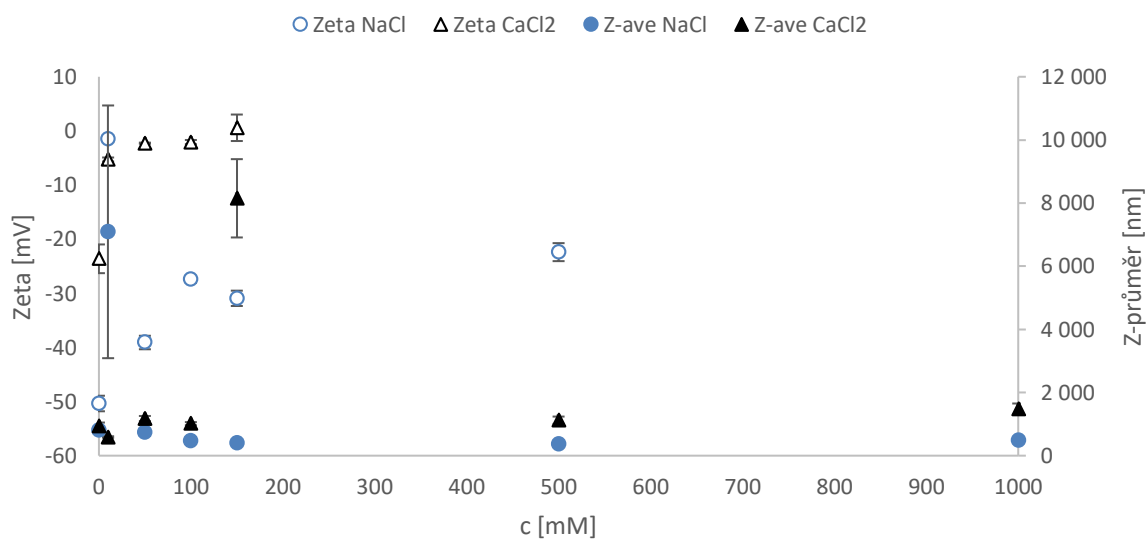
Z měření DLS a ELS je zřejmé, že vodivost vzorků prudce narůstá s rostoucí koncentrací solí, což je způsobeno vodivostí této soli (Obrázek 18). Vodivost vzorků pro interakci s BSA se příliš nemění. Velikost částic naopak klesá s rostoucí koncentrací aditiva, tedy hydrodynamický průměr se postupně zmenšuje. Toto je způsobeno opět zastíněním náboje řetězce a tím vznikají kompaktnější struktury o menší velikosti. Pro vzorky interakce s CaCl_2 je hydrodynamický průměr téměř neměnný (Obrázek 19). Zeta potenciál pomalu narůstá, ale hodnoty zůstávají stále nízké, což nasvědčuje stabilitě systému pro vzorky s NaCl a BSA (Obrázek 20). Naopak pro vzorky s CaCl_2 můžeme vidět nárůst zeta potenciálu, a tedy snížení stability systému (Obrázek 19), což je způsobeno zastíněním náboje nízkomolekulárním iontem.

Tabulka 6: Naměřená data DLS a ELS

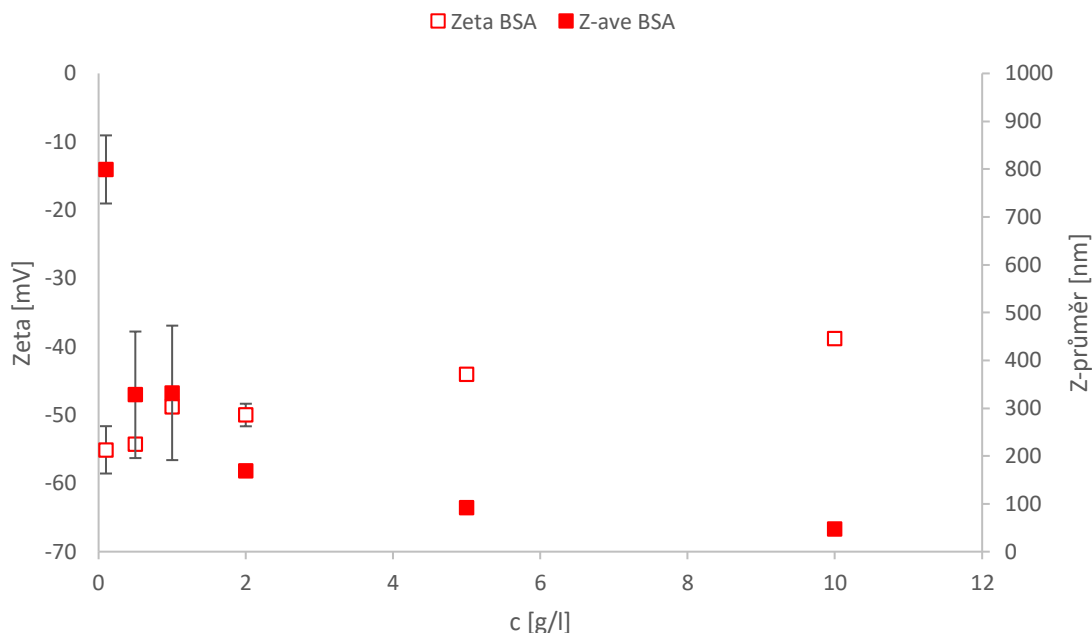
NaCl	c [mM]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0	0,604±0,013	809±81	-50,4±1,4
	10	2,963±0,015	7089±4002	-1,5±0,6
	50	3,493±0,133	734±101	-39,1±1,3
	100	6,480±0,148	459±6	-27,5±0,6
	150	8,433±0,301	401±27	-30,9±1,4
	500	26,333±1,415	359±26	-22,4±1,7
	1000		482±31	
CaCl_2	c [mM]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0	0,615±0,008	942±106	-23,6±2,7
	10	2,053±0,038	590±24	-5,3±0,4
	50	9,380±0,507	1175±82	-2,3±0,1
	100	17,333±0,379	1014±49	-2,1±0,4
	150	25,233±0,737	8151±1240	0,6±2,5
	500		1122±116	
	1000		1479±173	
BSA	c [g/l]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0,1	0,284±0,006	799±71	-55,1±3,5
	0,5	0,289±0,005	328±132	-54,2±0,4
	1	0,357±0,008	332±141	-48,8±1,0
	2	0,291±0,002	169±12	-50,0±1,7
	5	0,317±0,003	92±5	-44,0±0,5
	10	0,352±0,002	48±5	-38,8±0,4



Obrázek 18: Závislost vodivosti na koncentraci aditiva



Obrázek 19: Závislost hydrodynamického průměru a zeta potenciálu na koncentraci aditiva NaCl a CaCl₂



Obrázek 20: Závislost hydrodynamického průměru a zeta potenciálu na koncentraci aditiva BSA

Chromatografie

Pro měření interakce alginátu sodného bylo potřeba navýšit koncentraci alginátu na 2 g/l, protože při koncentraci 1 g/l byl chromatografický záznam příliš nízký a vykazoval nízkou hodnotu poměru signál/šum, což by ztížilo další studium konformačních změn v důsledku interakce s přidávanými aditivami. Při vyšší koncentraci již měření proběhlo podle očekávání.

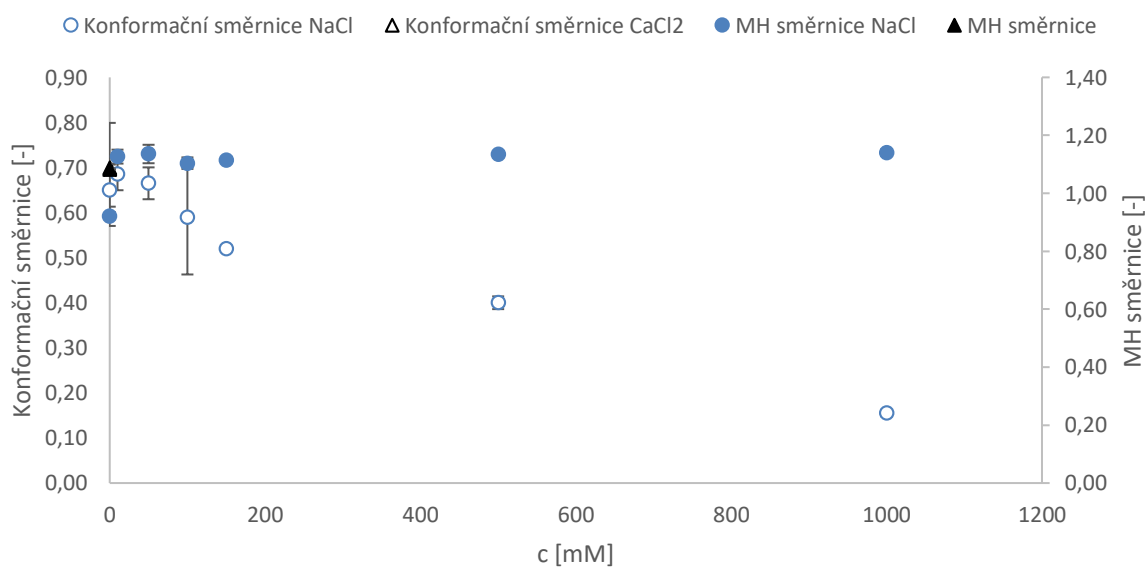
Při interakce alginátu sodného s NaCl bylo potvrzeno, že dochází spíše k vlivu iontové síly. Vlivem iontové síly se struktury stávají kompaktnější a protahují se do delších tyčinkovitých struktur, což můžeme vidět z koeficientu konformačního diagramu a z MHS diagramu, které jsou znázorněny na Obrázku 21. Nedochází zde k agregaci, protože detekovaná koncentrace se mění jen minimálně, to ukazuje Tabulka 7. Na rozdíl od kyseliny hyaluronové, zde ale dochází ke skokovému nárůstu molekulové hmotnosti při vysokých koncentracích soli (Obrázek 42).

Při měření interakcí alginátu sodného s CaCl_2 došlo k agregaci a již vzorky s koncentrací 10 mM CaCl_2 byly touto agregací ovlivněny. Další vzorky řady nebylo možno změřit, protože před samotnou chromatografickou analýzou je nutné vzorky vždy filtrovat přes 0,45 nm filtry. Zde v důsledku agregace alginátu s Ca^{2+} ionty došlo k vysrážení vzorku a následně všechny takto vzniklé agregáty byly zachyceny na pórech filtru. Analýza filtrátu již dále z tohoto důvodu neměla význam.

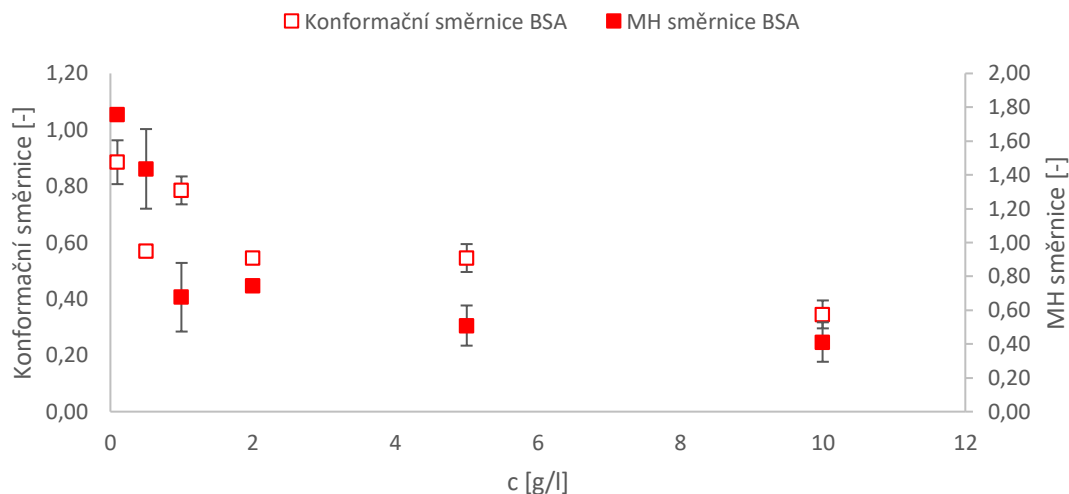
Alginát sodný a BSA mají podobnou molekulovou hmotnost, proto se píky vzniklého komplexu a nevázaného BSA spojily. Lze pozorovat interakce mezi BSA a alginátem sodným. Molekulová hmotnost roste a klesá gyrační poloměr s rostoucí koncentrací aditiva (Obrázek 43). Vznikají tedy těžší a kompaktnější struktury. Kompaktnější struktury můžeme vyvodit z klesajícího koeficientu konformačního diagramu a MH koeficientu (Obrázek 22).

Tabulka 7: Naměřená data ze SEC-MALS

NaCl	c [mM]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Vnitřní viskozita [mL/g]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0	29±1	31,2±0,4	83±3	1,68±0,03
	10	28±0	22,5±0,4	92±1	1,74±0,10
	50	29±0	23,2±0,0	97±0	1,75±0,07
	100	30±0	22,9±0,8	102±1	1,90±0,04
	150	31±0	24,5±0,8	105±1	1,98±0,03
	500	33±0	26,9±0,1	106±1	1,86±0,01
	1000	44±0	25,8±0,3	133±1	1,55±0,07
CaCl ₂	c [mM]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Vnitřní viskozita [mL/g]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0	37±1	24,4±0,6	2±0	125,93±1,54
	10	4±4		14±1	0,0379±0,02
	50				
	100				
	150				
	500				
	1000				
BSA	c [g/l]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Vnitřní viskozita [mL/g]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0,1	46±0	22,5±0,8	111±2	2,85±0,03
	0,5	60±0	16,8±0,5	75±1	4,00±0,03
	1	63±1	15,1±0,1	63±1	4,70±0,10
	2	68±0	12,5±0,3	48±0	6,17±0,05
	5	74±0	8,8±0,4	25±0	12,19±0,02
	10	77±0	7,1±0,1	16±0	21,44±0,01



Obrázek 21: Závislost MH a konformačního koeficientu na koncentraci aditiva



Obrázek 22: Závislost MH a konformačního koeficientu na koncentraci BSA

5.2 Kladně nabitě polyelektrolyty

5.2.1 DEAE-dextran hydrochlorid

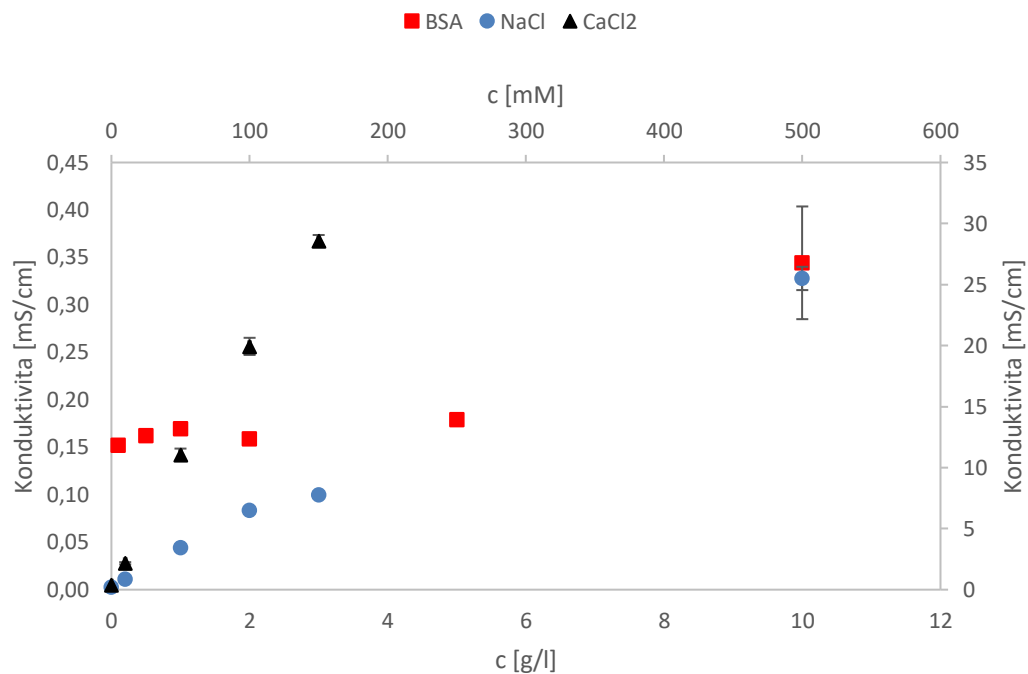
Jednoduché fyzikálně-chemické metody

Metodou UV-VIS spektrometrie byla naměřena absorpční spektra, která znovu rostou s rostoucí koncentrací aditiva. Absorpční spektra jsou v příloze (Obrázek 45, Obrázek 46, Obrázek 47).

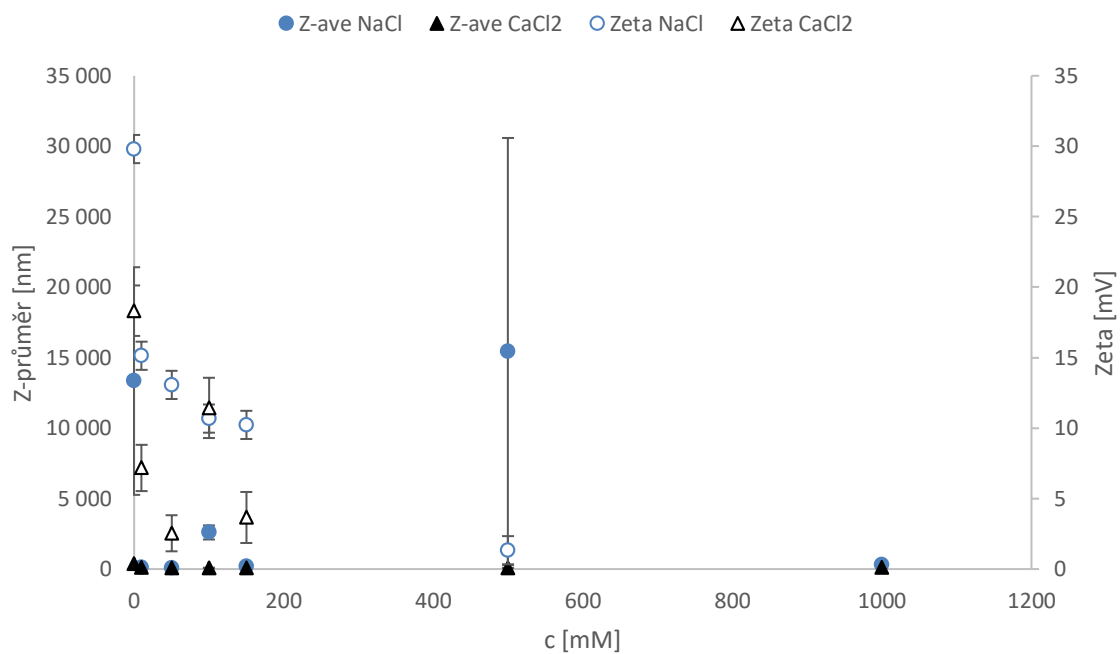
Z naměřených dat pomocí metod DLS a ELS je vidět, že díky kladnému náboji jak DEAE, tak aditiv, je i chování vzorků odlišné od záporně nabitých polyelektrolytů. Vodivost roste s koncentrací aditiva, to je opět dané vodivostí přidaného aditiva (Obrázek 23). Hydrodynamický průměr u všech aditiv klesá s rostoucí koncentrací, největší změna byla pozorována u NaCl (Obrázek 24). U zeta potenciálu byly naměřeny kladné hodnoty, a to právě díky kladnému náboji dextranu. Hodnoty zeta potenciálu postupně klesaly, což nasvědčuje menší stabilitě systému v důsledku přidavku nízkomolekulárního elektrolytu, který odstiňuje náboj na řetězci dextranu. Výsledky měření jsou shrnuty v Tabulce 8.

Tabulka 8: Naměřená data z DLS a ELS

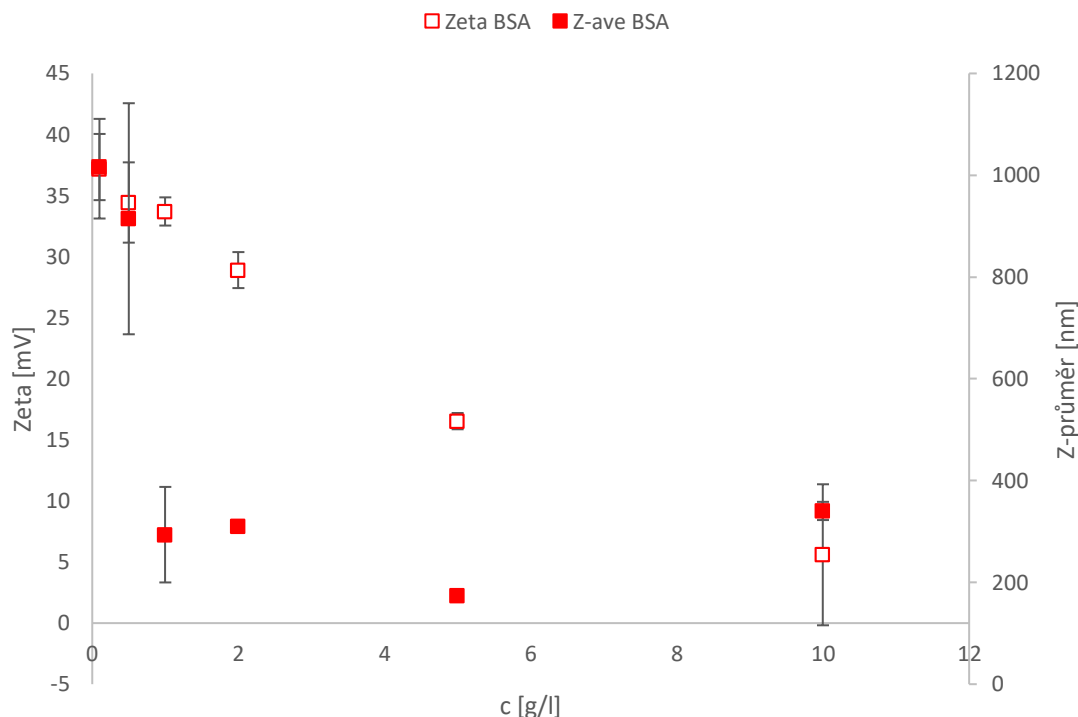
NaCl	c [mM]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0	0,217±0,007	13340±8075	29,8±0,7
	10	0,879±0,015	102±1	15,1±0,8
	50	3,430±0,087	62±12	13,1±2,9
	100	6,480±0,199	2598±499	10,7±0,9
	150	7,760±0,251	187±58	10,2±0,6
	500	25,500±0,954	15441±15144	1,3±3,8
	1000		292±90	
CaCl ₂	c [mM]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0	0,398±0,006	375±45	18,3±1,8
	10	2,160±0,095	108±4	7,2±1,6
	50	11,067±0,493	90±2	2,5±1,3
	100	19,933±0,702	87±1	11,4±2,1
	150	28,567±0,493	78±2	3,7±1,8
	500		86±6	
	1000		105±2	
BSA	c [g/l]	Konduktivita [mS/cm]	Z-průměr [nm]	Zeta [mV]
	0,1	0,152±0,001	1016±65	37,2±4,1
	0,5	0,162±0,002	914±227	34,4±3,3
	1	0,169±0,003	294±99	33,7±1,2
	2	0,159±0,002	310±13	28,9±1,5
	5	0,179±0,002	174±4	16,5±0,7
	10	0,344±0,059	340±18	5,6±5,8



Obrázek 23: Závislost vodivosti na koncentraci aditiva



Obrázek 24: Závislost hydrodynamického průměru a zeta potenciálu na koncentraci aditiva NaCl a CaCl₂



Obrázek 25: Závislost hydrodynamického průměru a zeta potenciálu na koncentraci aditiva BSA

Chromatografie

Pro měření vzorků dextranu bylo nutno použít mobilní fázi s vysokou iontovou silou, aby se zminimalizovala sorpce polysacharidu na stacionární fázi. Díky sorpci polysacharidu na stacionární fázi se snižuje koncentrace a zhoršuje separace. Když se tedy zvýší iontová síla, utlumí se tato interakce a je možné měřit i kladně nabitě polyelektrolyty. Při měření vzorků dextranů nebyl použit viskozimetrický detektor. Aby se dextran mohl měřit, musela být nejdříve proměřena hodnota dn/dc , která byla stanovena na 0,156 mL/g. Dn/dc hodnota se používá pro přepočítání rozptylu světla na molekulovou hmotnost.

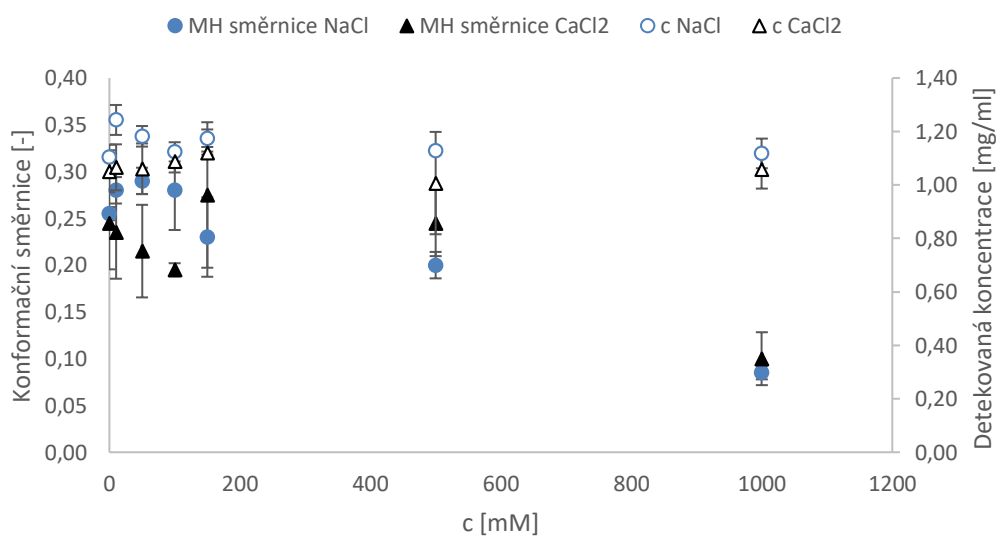
Zvyšující se iontová síla přidáním NaCl se projevuje také u dextranu. Struktury jsou s rostoucí koncentrací aditiva kompaktnější, což může být pozorováno na změně koeficientu konformačního diagramu (Obrázek 26). Nedochází zde ani k agregaci, což dokazuje téměř neměnná detekovaná koncentrace (Tabulka 9).

Jelikož je dextran v roztoku kladně nabitý nedochází ani k interakcím s $CaCl_2$. Dochází zde opět pouze ke zvyšování iontové síly. To je potvrzeno neměnnou molekulovou hmotností a gyračním poloměrem (Tabulka 9). Zvýšením iontové síly se struktury stávají kompaktnější, což je vidět na změně koeficientu konformačního diagramu (Obrázek 26).

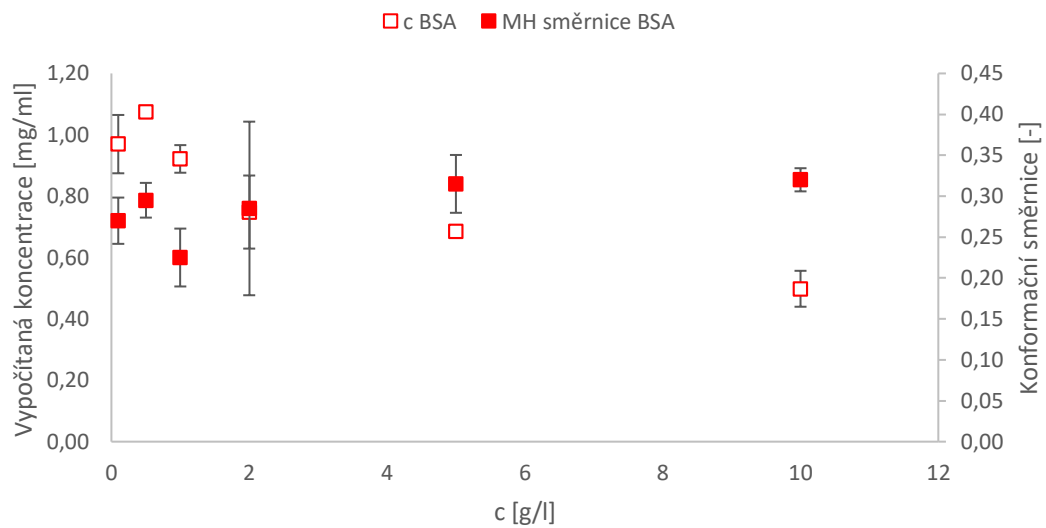
Při měření vzorků dextranu s BSA bylo zjištěno, že zde k interakcím dochází, a to na základě toho, že se od koncentrace 5 g/l skokově změní molekulová hmotnost a gyrační poloměr vzniklého komplexu (Obrázek 49). Dochází také k nabobtnání řetězců, což je zřejmé z koeficientu konformačního diagramu. Na druhou stranu je zde stále hodně nevázaného BSA.

Tabulka 9: Naměřená data ze SEC-MALS

NaCl	c [mM]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0	565±1	20±1	1,10±0,05
	10	494±13	20±0	1,24±0,06
	50	454±21	21±0	1,18±0,04
	100	459±12	20±1	1,12±0,04
	150	423±27	20±1	1,17±0,03
	500	439±12	21±0	1,13±0,01
	1000	313±58	22±0	1,12±0,06
CaCl ₂	c [mM]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0	577±0	20±2	1,05±0,08
	10	583±9	20±1	1,07±0,09
	50	585±2	19±1	1,06±0,09
	100	592±8	20±1	1,09±0,04
	150	572±8	21±2	1,12±0,01
	500	582±3	22±0	1,01±0,19
	1000	577±5	22±0	1,06±0,07
BSA	c [g/l]	Mw [kDa]	Rw [nm]	Detekovaná koncentrace [mg/ml]
	0,1	656±39	23±3	0,97±0,10
	0,5	620±15	22±1	1,08±0,01
	1	667±1	21±1	0,92±0,05
	2	805±65	23±3	0,75±0,12
	5	858±19	25±1	0,69±0,01
	10	1164±156	26±3	0,50±0,06



Obrázek 26: Závislost detekované koncentrace a konformačního koeficientu na koncentraci aditiva NaCl a CaCl₂



Obrázek 27: Závislost detekované koncentrace a konformačního koeficientu na koncentraci aditiva BSA

6 Závěr

Cílem práce bylo prozkoumání strukturních a konformačních změn při interakci biopolymerů. Využitými metodami byly techniky rozptylu světla, a to UV-VIS spektrometrie, dynamický a elektroforetický rozptyl světla a SEC-MALS.

Pro experimentální práci byly využity následující polysacharidy: kyselina hyaluronová i molekulových hmotnostech 250 – 450 kDa a 1500 – 1750 kDa, alginát sodný a dextran. Jako interagující látky byly použity NaCl, CaCl₂ a protein BSA.

V první části experimentu byla proměřena absorpční spektra, která sloužila pouze k hrubému rozlišení, zda v systému dochází k agregaci či nikoliv. Následovalo měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla, kdy se měření zaměřilo na parametry hydrodynamický poloměr, zeta potenciál a vodivost. Vodivost se měnila zejména díky přidaným solím, protože ty samy o sobě lépe vedou než polysacharidy. Při vysokých koncentracích díky vysoké vodivosti nebylo možné ani změřit vodivost, a tím pádem ani stanovit stabilitu systému. Hydrodynamický průměr se obecně snižoval s rostoucí koncentrací aditiva. Zeta potenciál se u záporných polyelektrolytů zvyšoval a u kladného dextranu se zvyšoval s rostoucí koncentrací aditiva.

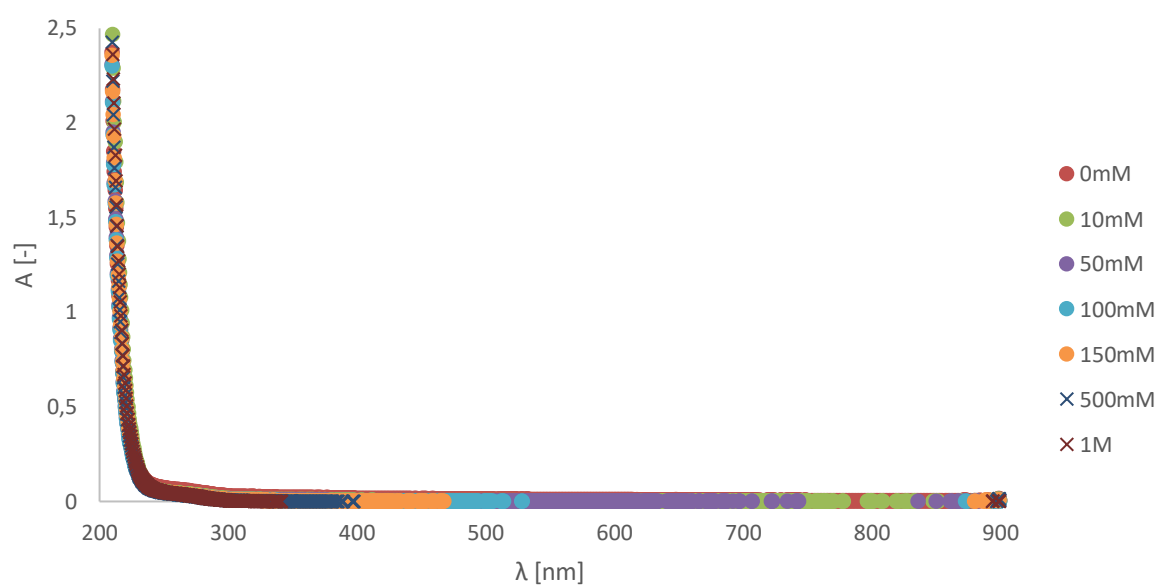
Druhá část experimentů v rámci bakalářské práce byla zaměřena na změření vzorků pomocí velikostně vylučovací chromatografie s detektorem rozptylu světla a viskozimetrickým detektorem. Zde bylo potvrzeno, že NaCl pouze zvyšuje iontovou sílu a díky tomuto efektu dochází ke konformačním a strukturním změnám, ovšem dle předpokladů nebyla pozorována agregace v systému. K interakcím dochází s Ca²⁺ ionty a s proteinem BSA. Při interakci s CaCl₂ dochází při vyšších koncentracích k agregaci a obecně ke vzniku kompaktnějších struktur s nižší molekulovou hmotností. Při ještě vyšších přídavcích pak dojde ke kompletnímu vysrážení a fázové separaci komplexu od disperzního prostředí. Při interakci s BSA nedochází k agregaci, struktury se postupně prodlužují, ale navázané BSA brání přiblížení řetězců a viskozita se nesnižuje. V těchto případech zůstává v roztoku velké množství nevázaného BSA, kterému se nemění molekulová hmotnost ani gyrační poloměr. V případě kladně nabitého dextranu dochází k interakcím pouze s BSA, NaCl a CaCl₂ pouze zvyšují iontovou sílu a tím částečně ovlivňují konformaci řetězců v roztoku.

7 Seznam použitých zdrojů

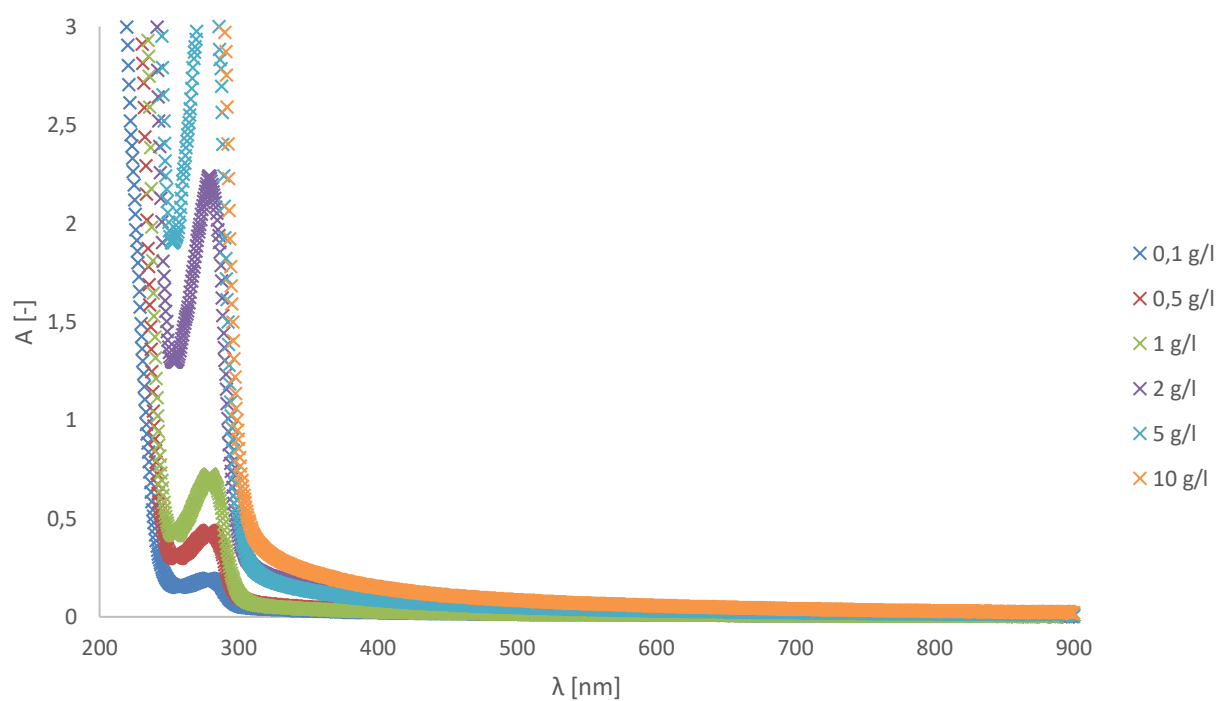
- 1) VODRÁŽKA, Zdeněk a M. HOFRICHTER. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- 2) STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester, 2003. ISBN 35-273-0226-3.
- 3) FLEER, G. J. *Polymers at interfaces*. New York, 1993. ISBN 978-041-2581-601
- 4) PODZIMEK, Stepan. *Light scattering, size exclusion chromatography, and asymmetric flow field flow fractionation: powerful tools for the characterization of polymers, proteins and nanoparticles*. Hoboken, N.J.: Wiley, c2011. ISBN 978-0-470-38617-0.
- 5) *Gyrační poloměr* [online]. [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/gyracni_polomer.html
- 6) *Využití dynamického rozptylu světla k měření viskozity*. *Chempoint* [online]. [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-dynamickeho-rozptylu-svetla-k-mereni-viskozity>
- 7) *Koeficient polydisperzity* [online]. [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/koeficient_polydisperzity.html
- 8) WHITE, Robin J., Vitaly BUDARIN, Rafael LUQUE, James H. CLARK a Duncan J. MACQUARRIE. *Tuneable porous carbonaceous materials from renewable resources*. *Chemical Society Reviews*. 2009, **38**(12). DOI: 10.1039/b822668g. ISSN 0306-0012. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b822668g>
- 9) STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 35-273-0227-1.
- 10) HUGLIN, M. B. (editor), *Light Scattering from Polymer Solutions*, Academic Press, London (1972)
- 11) *Elektrická dvojvrstva*. [Http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/elektricka_dvojvrstva.html](http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/elektricka_dvojvrstva.html) [online]. [cit. 2019-05-08].
- 12) *Potenciál zeta a elektrická dvojvrstva*. [Https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm](https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm) [online]. [cit. 2019-05-08].
- 13) *Zetasizer Nano Příručka pro uživatele*. 3. vydání. Malvern instruments Ltd., Spojené království, 2007, 191 s.].
- 14) KULICKE, Werner-Michael. a Christian. CLASEN. *Viscosimetry of polymers and polyelectrolytes*. New York: Springer, c2004. ISBN 35-404-0760-X.
- 15) LEBLANC, G. E., R. A. SECCO a M. KOSTIC. *Viscosity Measurement*. CRC Press LLC. 1999.
- 16) PENG, Yanfei a Lina ZHANG. *Characterization of a polysaccharide–protein complex from Ganoderma tsugae mycelium by size-exclusion chromatography combined with laser light scattering*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2003, **56**(1-3), 243-252. DOI: 10.1016/S0165-022X(03)00062-9. ISSN 0165022X.
- 17) TARAZONA, M.Pilar a Enrique SAIZ. *Combination of SEC/MALS experimental procedures and theoretical analysis for studying the solution properties of macromolecules*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2003, **56**(1-3), 95-116. DOI: 10.1016/S0165-022X(03)00075-7. ISSN 0165022X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165022X03000757>

- 18) ZHOU, Yun, Siqing XIA, Binh T. NGUYEN, Min LONG, Jiao ZHANG a Zhiqiang ZHANG. *Interactions between metal ions and the biopolymer in activated sludge: quantification and effects of system pH value*. 2017, **11**(1), -. DOI: 10.1007/s11783-017-0898-6. ISSN 2095-2201.
- 19) HANSSON, Per a Björn LINDMAN. Surfactant-polymer interaction. *Current Chemistry*. 1996, , 604-613. ISSN 1359-0294.
- 20) SANTOS, Monique Barreto, Bernardo de Sá COSTA, Edwin Elard Garcia ROJAS, Gwendolyn LAWRIE a Lisbeth GRØNDAHL. Calorimetric techniques applied to the thermodynamic study of interactions between proteins and polysaccharides. *Ciência Rural*. 2016, **46**(8), 1491-1497. DOI: 10.1590/0103-8478cr20151313. ISSN 0103-8478.
- 21) THÜNEMANN, Andreas F., Martin MÜLLER, Herbert DAUTZENBERG, Jean-François JOANNY a Hartmut LÖWEN. Polyelectrolyte Complexes. *Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004, , 113-171. Advances in Polymer Science. DOI: 10.1007/b11350. ISBN 978-3-540-00556-8. Dostupné také z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/b11350>
- 22) MALDONADO, L. a J. KOKINI. An optimal window for the fabrication of Edible Polyelectrolyte Complex Nanotubes (EPCNs) from bovine serum albumin (BSA) and sodium alginate. *Food Hydrocolloids*. 2018, **77**, 336-346. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.10.010. ISSN 0268005X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X17309979>
- 23) WANG, Yanqing, Ying WANG, Qiang LUO, Hongmei ZHANG a Jian CAO. Molecular characterization of the effects of Ganoderma Lucidum polysaccharides on the structure and activity of bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2019, **206**, 538-546. DOI: 10.1016/j.saa.2018.08.051. ISSN 13861425. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142518308308>
- 24) SLOTBOOM, Dirk Jan, Ria H. DUURKENS, Kees OLIEMAN a Guus B. ERKENS. Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution. *Methods*. 2008, **46**(2), 73-82. DOI: 10.1016/j.ymeth.2008.06.012. ISSN 10462023. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202308000996>
- 25) EISSA, Ahmed S., David HAYES, Peter J. SHERWOOD, Walter F. STAFFORD a John J. CORREIA. Effect of SDS on whey protein polymers. Molecular investigation via dilute solution viscometry and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloids*. 2019, **87**(7), 97-100. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.07.046. ISSN 0268005X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X18307288>
- 26) JACHIMSKA, Barbara, Monika WASILEWSKA a Zbigniew ADAMCZYK. Characterization of Globular Protein Solutions by Dynamic Light Scattering, Electrophoretic Mobility, and Viscosity Measurements. *Langmuir*. 2008, **24**(13), 6866-6872. DOI: 10.1021/la800548p. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la800548p>

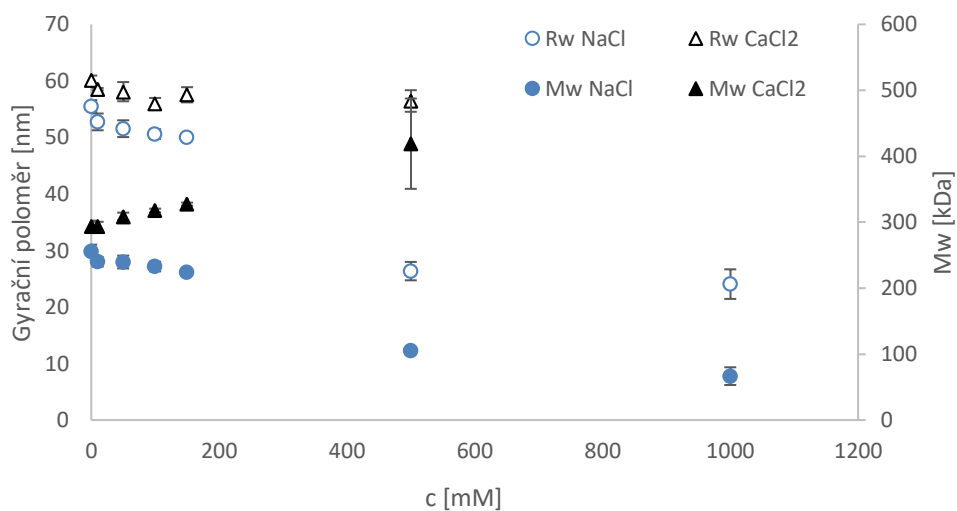
8 Přílohy



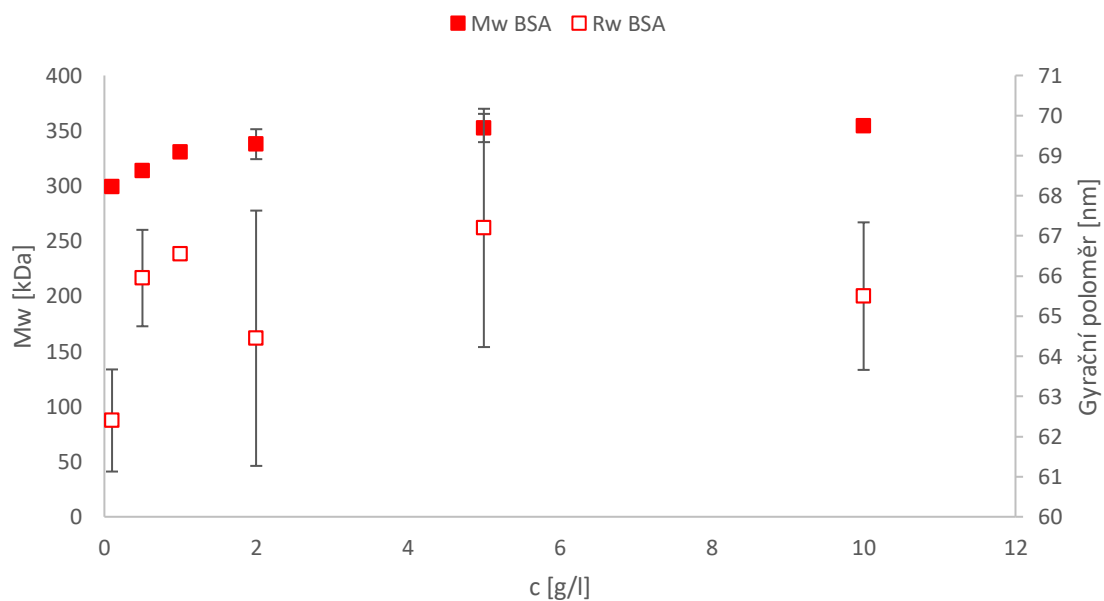
Obrázek 28: Absorpční spektrum kyselina hyaluronová 250 - 450 kDa a CaCl_2



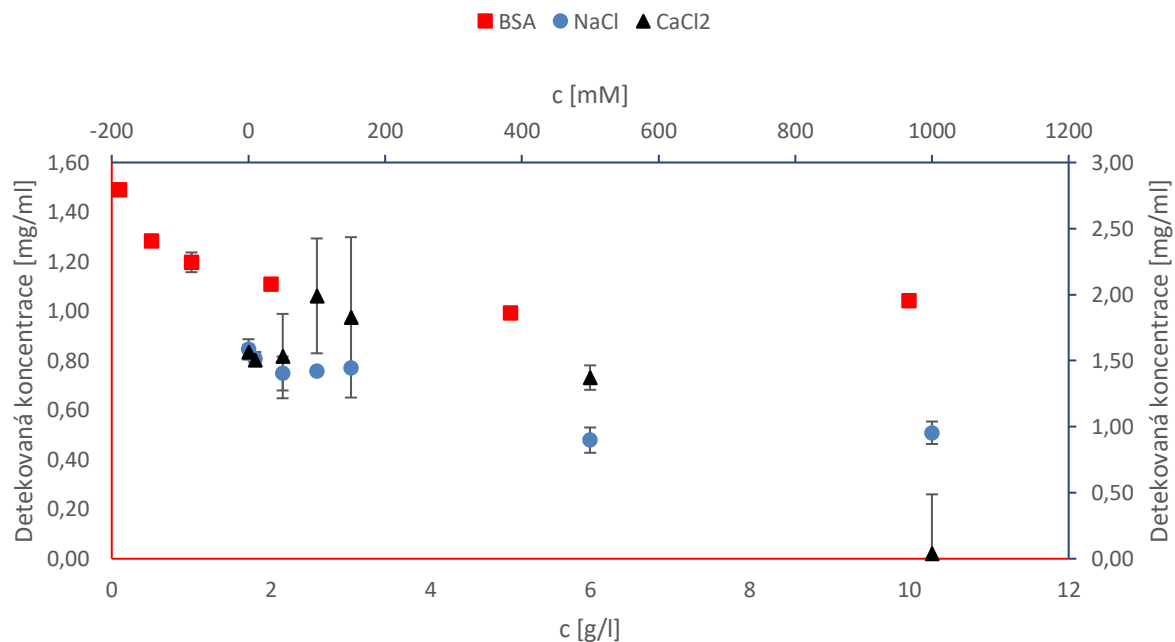
Obrázek 29: Absorpční spektrum kyselina hyaluronová 250 - 450 kDa a BSA



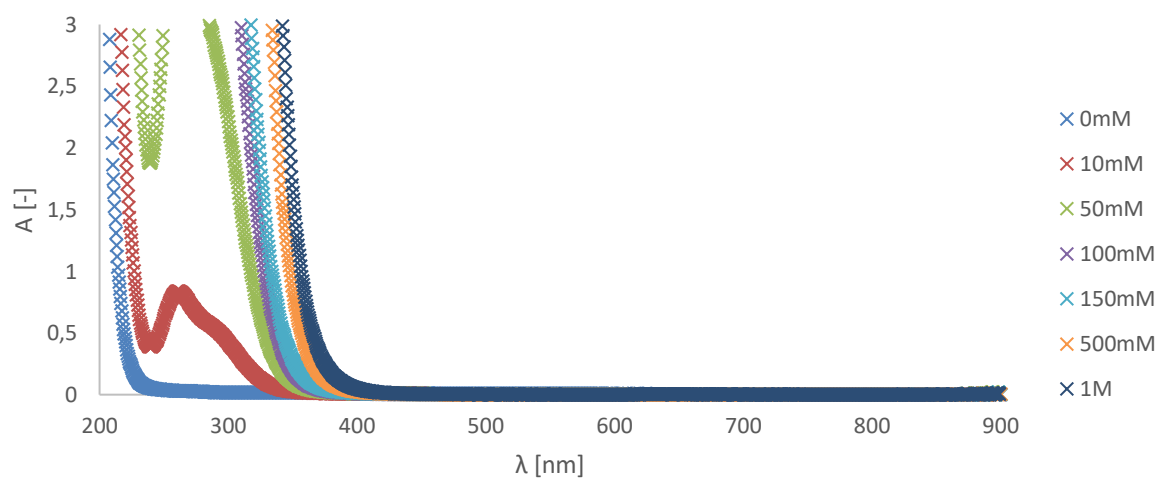
Obrázek 30: Závislost molekulové hmotnosti a gyračního poloměru na koncentraci aditiva NaCl a CaCl_2 při interakci s kyselinou hyaluronovou 250 – 450 kDa



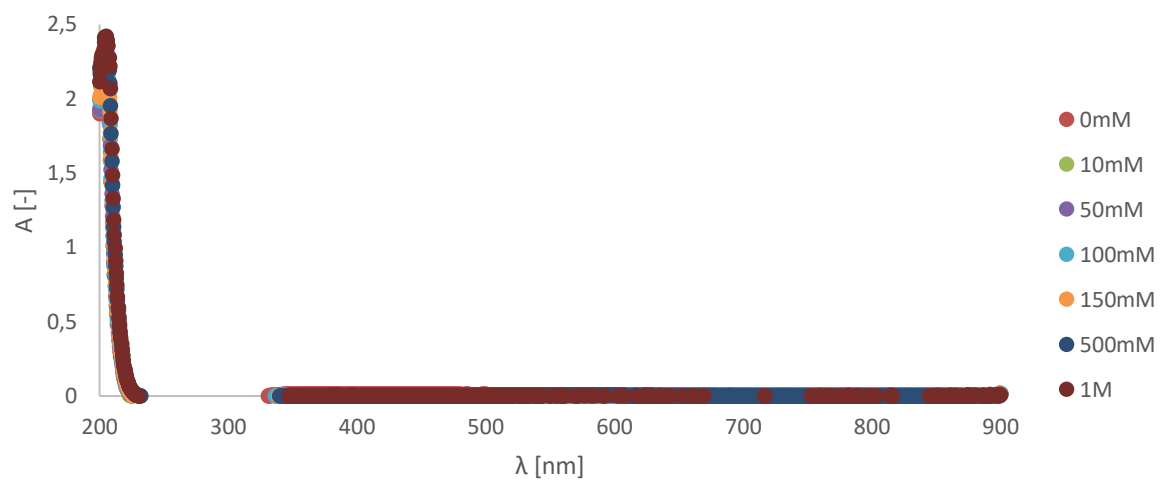
Obrázek 31: Závislost molekulové hmotnosti a gyračního poloměru na koncentraci aditiva BSA při interakci s kyselinou hyaluronovou 250 – 450 kDa



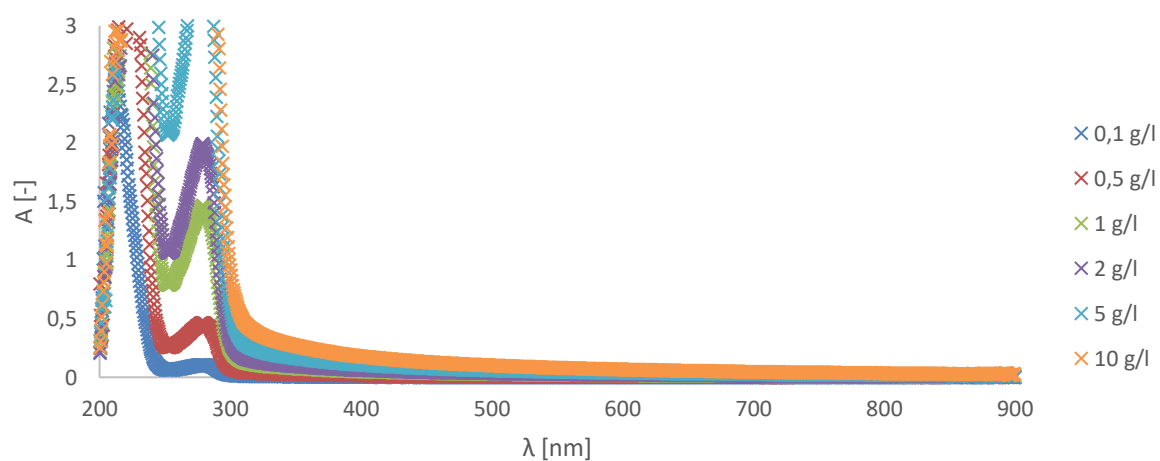
Obrázek 32: Závislost detekované koncentrace na koncentraci aditiv při interakci s kyselinou hyaluronovou 250 – 450 kDa



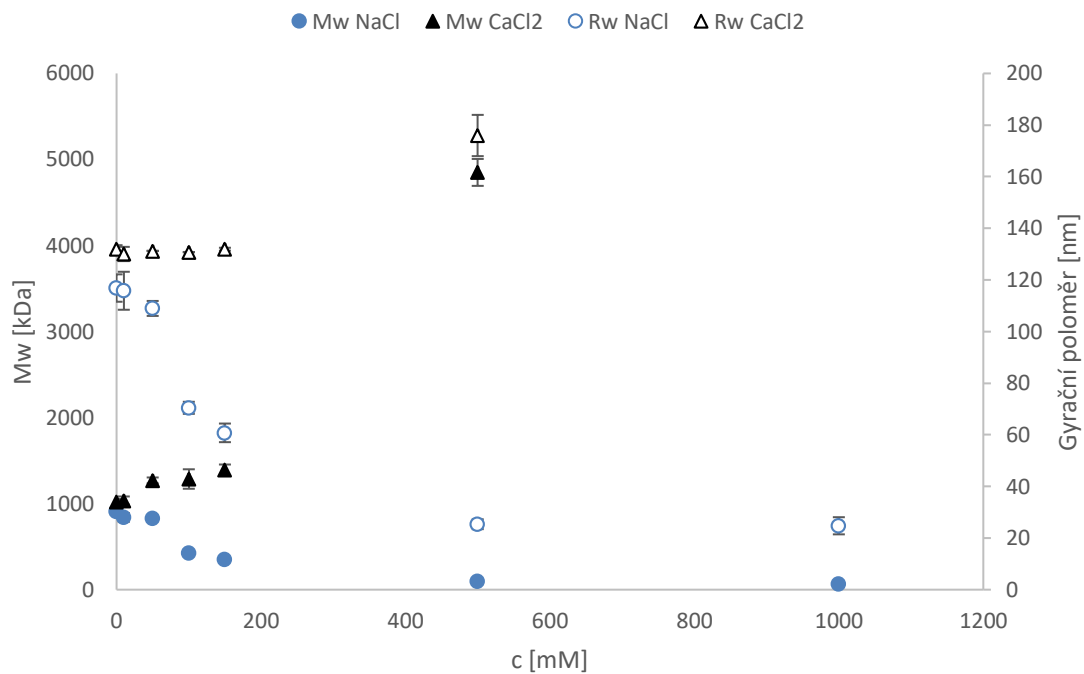
Obrázek 33: Absorpční spektrum kyselina hyaluronová 1500 - 1750 kDa a NaCl



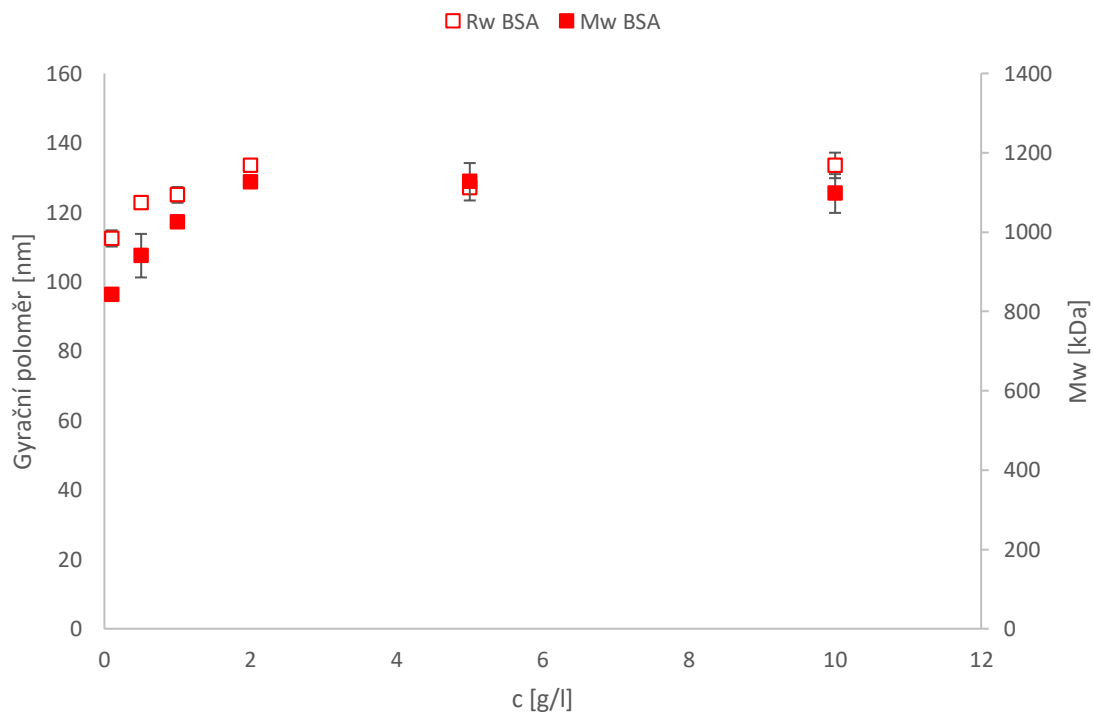
Obrázek 34: Absorpční spektrum kyselina hyaluronová 1500 - 1750 kDa a CaCl_2



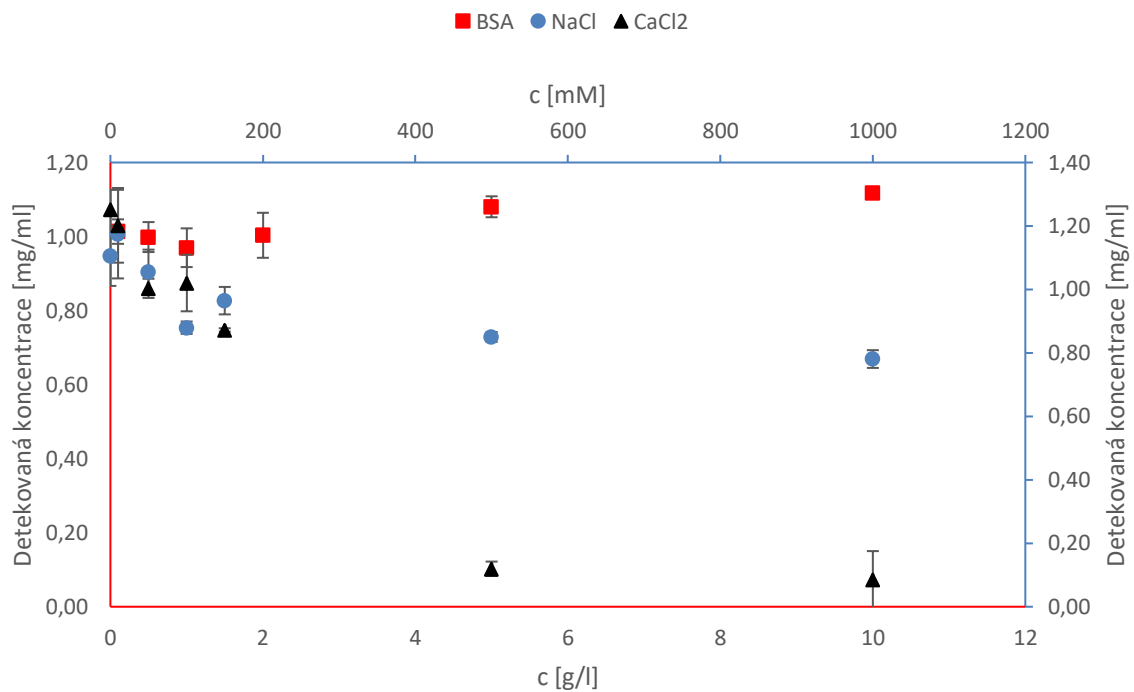
Obrázek 35: Absorpční spektrum kyselina hyaluronová 1500 - 1750 kDa a BSA



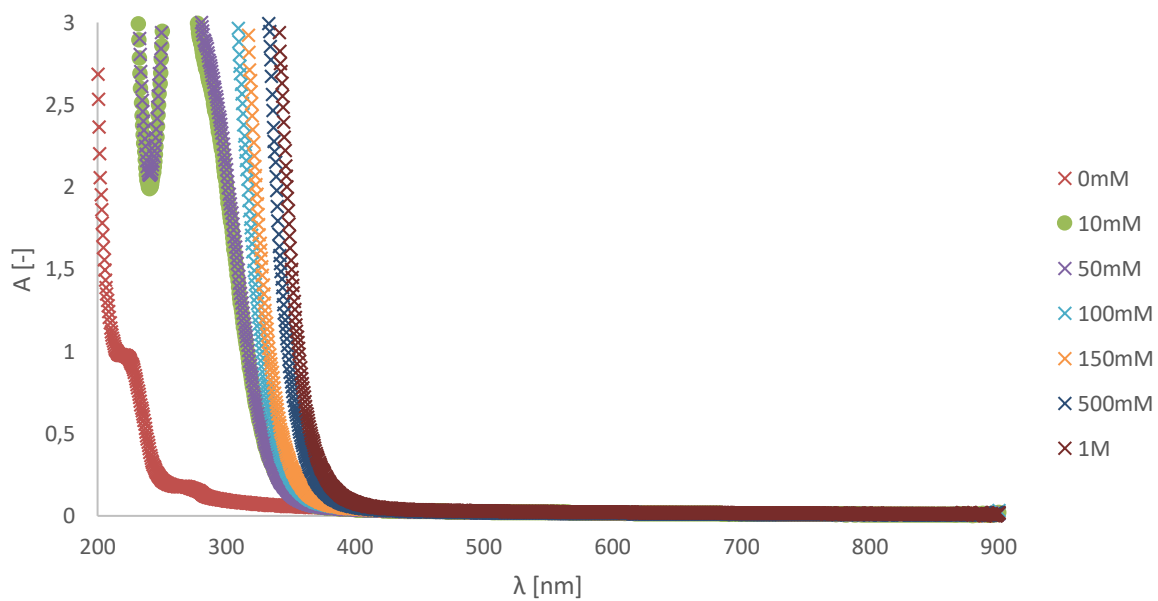
Obrázek 36: Závislost molekulové hmotnosti a gyračního poloměru na koncentraci aditiva NaCl a CaCl₂ při interakci s kyselinou hyaluronovou 1500 – 1750 kDa



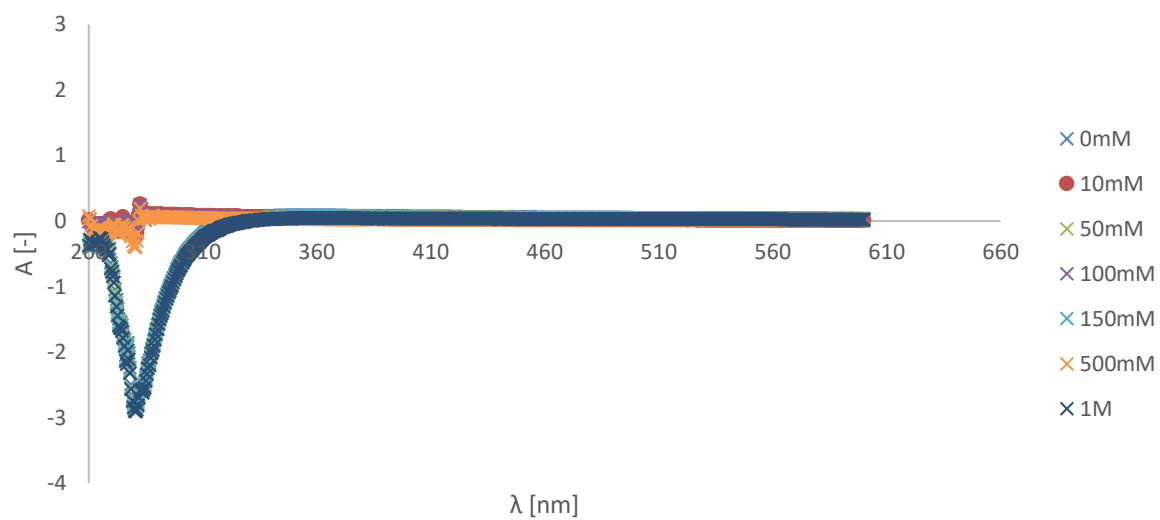
Obrázek 37: Závislost molekulové hmotnosti a gyračního poloměru na koncentraci aditiva BSA při interakci s kyselinou hyaluronovou 1500 – 1750 kDa



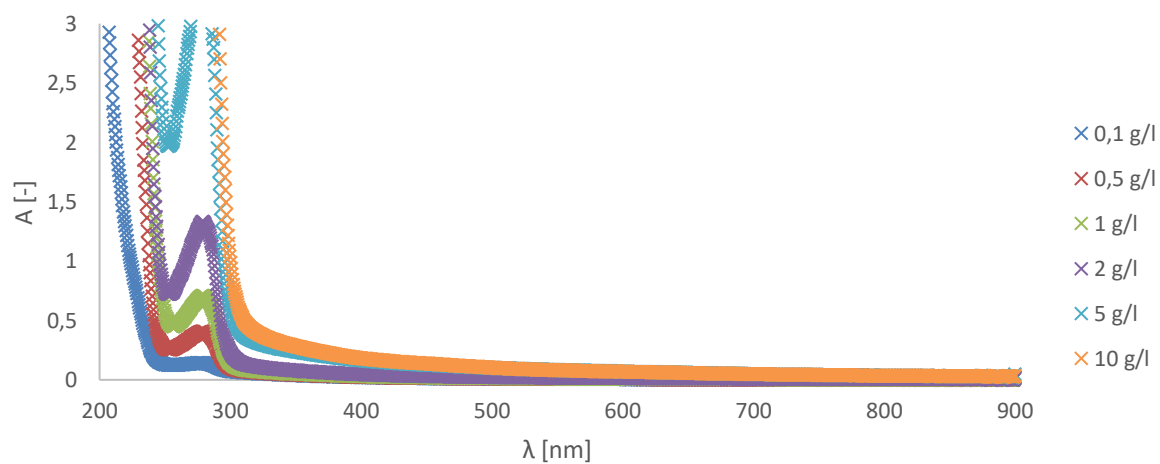
Obrázek 38: Závislost detekované koncentrace na koncentraci aditiv při interakci s kyselinou hyaluronovou 1500 – 1750 kDa



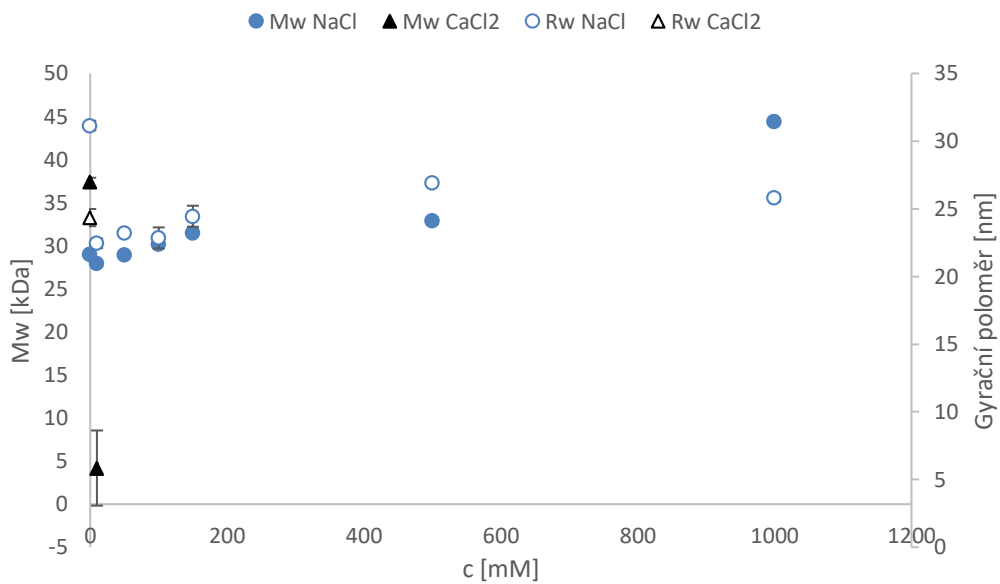
Obrázek 39: Absorpční spektrum alginát sodný a NaCl



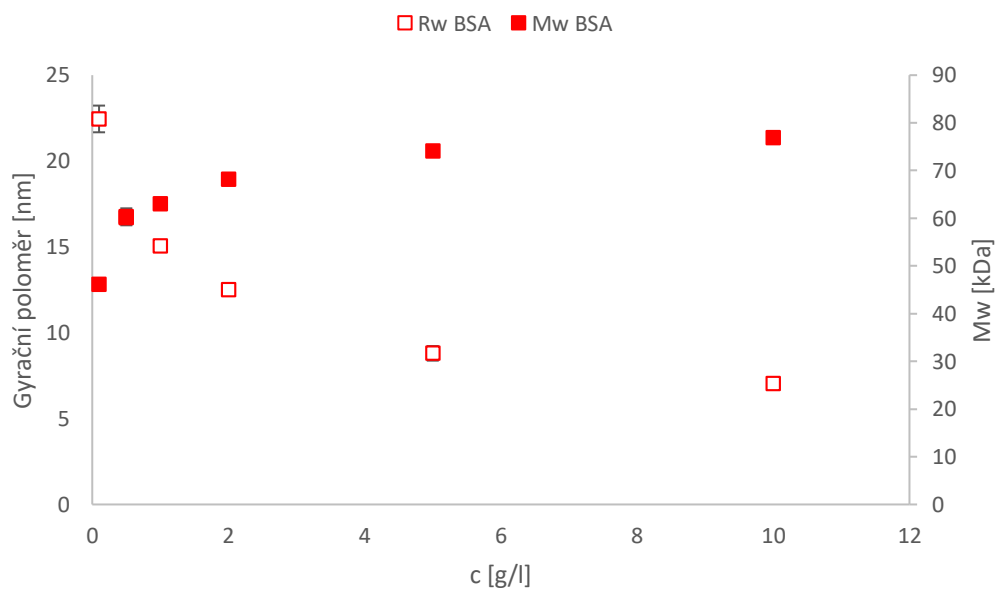
Obrázek 40: Absorpční spektrum alginát sodný a CaCl_2



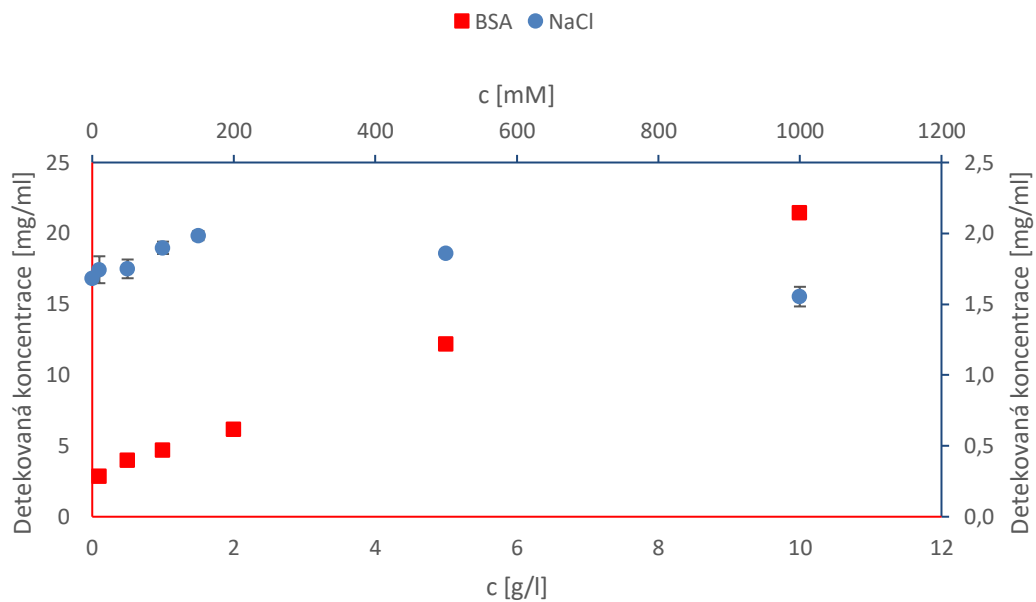
Obrázek 41: Absorpční spektrum alginát sodný a BSA



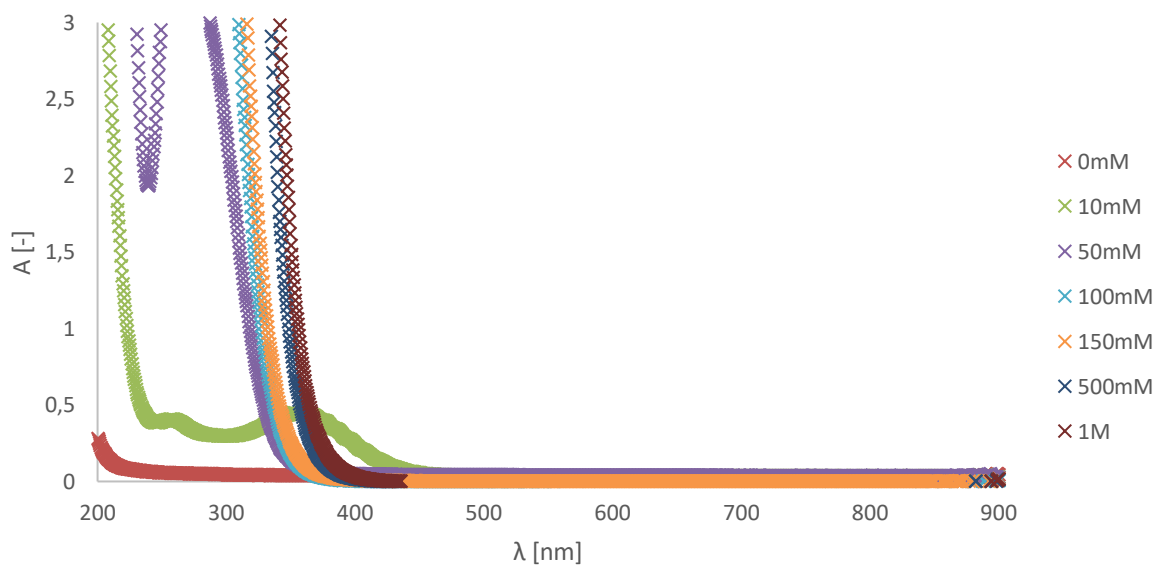
Obrázek 42: Závislost molekulové hmotnosti a gyračního poloměru na koncentraci aditiva při interakci s alginátem sodným



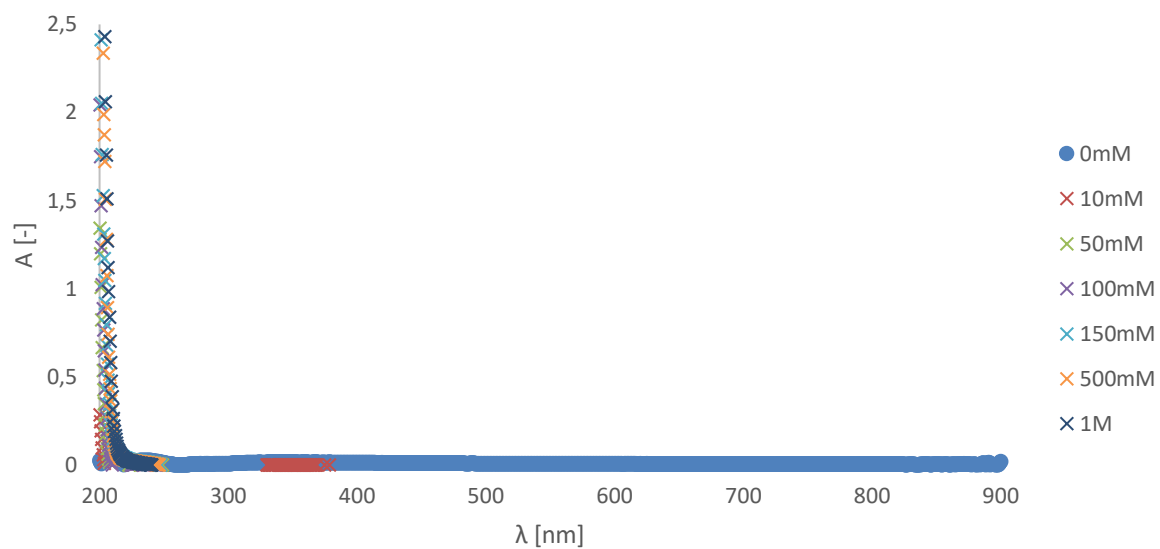
Obrázek 43: Závislost molekulové hmotnosti a gyračního poloměru na koncentraci BSA při interakci s alginátem sodným



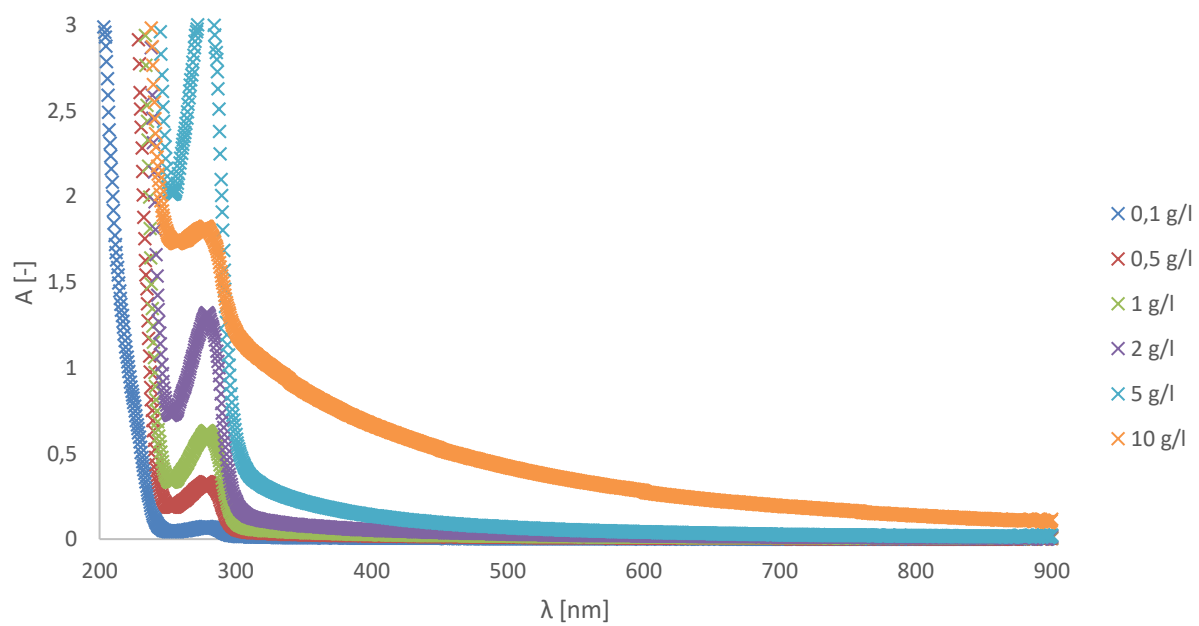
Obrázek 44: Závislost detekované koncentrace na koncentraci aditiva při interakci s alginátem sodným



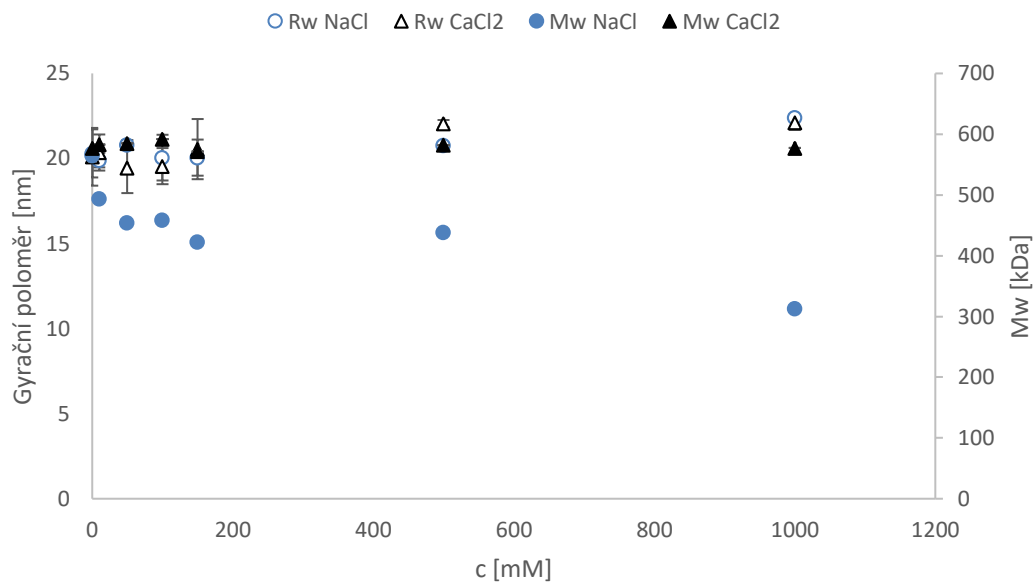
Obrázek 45: Absorpční spektrum DEAE-dextran hydrochlorid a NaCl



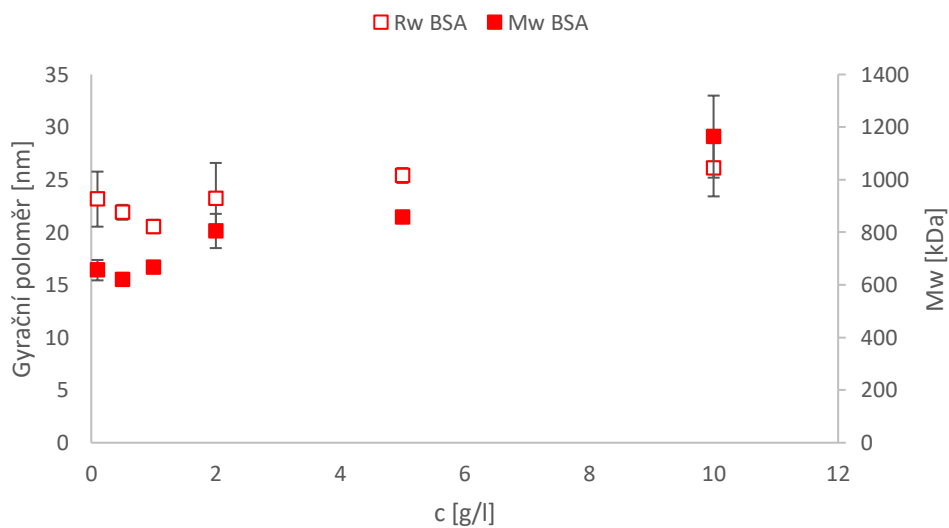
Obrázek 46: Absorpční spektrum DEAE-dextran hydrochlorid a CaCl_2



Obrázek 47: Absorpční spektrum DEAE-dextran hydrochlorid a BSA



Obrázek 48: Závislost molekulové hmotnosti a gyračního poloměru na koncentraci aditiva NaCl a CaCl₂ při interakci s DEAE-dextran hydrochloridem



Obrázek 49: Závislost molekulové hmotnosti a gyračního poloměru na koncentraci aditiva BSA při interakci s DEAE-dextran hydrochloridem